

AM LEHRSTUHL  
FÜR INNERE MEDIZIN I  
LEITERIN: PROF. DR. MED. MARTINA MÜLLER-SCHILLING  
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**EINFLUSS VON PSYCHOSOZIALEM STRESS  
AUF DIE INTESTINALE BARRIERE:**  
Untersuchungen am Mausmodell

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin  
der Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Nadja Beitelrock

2014



AM LEHRSTUHL  
FÜR INNERE MEDIZIN  
LEITERIN: PROF. DR. MED. MARTINA MÜLLER-SCHILLING  
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**EINFLUSS VON PSYCHOSOZIALEM STRESS  
AUF DIE INTESTINALE BARRIERE:**  
Untersuchungen am Mausmodell

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Nadja Beitelrock

2014

Dekan: Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Florian Obermeier

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Stefan O. Reber

Tag der mündlichen Prüfung: 24. Oktober 2014

	<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>8</b>
<b>I</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>10</b>
<b>1</b>	<b>Stress.....</b>	<b>11</b>
1.1	Akuter Stress.....	12
1.1.1	Hypothalamo-Pituitary-Adrenal-Achse (HPA-Achse).....	13
1.1.2	Das vegetative Nervensystem (VNS).....	14
	Der Sympathikus und der Parasympathikus.....	15
1.2	Chronischer Stress.....	16
<b>2</b>	<b>Stress und chronisch-entzündliche Darmerkrankungen (CED).....</b>	<b>17</b>
2.1	Auswirkungen von Stress auf die intestinale Barrierefunktion.....	17
2.2	Auswirkungen von Stress auf die intestinale Immunfunktion.....	18
2.2.1	Immunglobulin A (IgA).....	18
2.2.2	Antimikrobielle Peptide.....	19
2.3	Stress und Colitis ulcerosa (CU).....	21
2.4	Stress und Morbus Crohn (MC).....	22
<b>3</b>	<b>Zielsetzung.....</b>	<b>22</b>
<b>II</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>24</b>
<b>1</b>	<b>Versuchstiere.....</b>	<b>24</b>
<b>2</b>	<b>Chronisch-subordinierte Koloniehaltung (chronic subordinate colony (CSC) housing).....</b>	<b>24</b>
<b>3</b>	<b>Experimenteller Ablauf und Organentnahme.....</b>	<b>25</b>
<b>4</b>	<b>Isolation/Inkubation der intestinalen Epithelzellen sowie der Lamina propria mononukleären Zellen (LPMZ).....</b>	<b>25</b>
<b>5</b>	<b>Apoptose-Nachweis.....</b>	<b>27</b>
5.1	Caspase III-Aktivitäts-Messung.....	28

5.2	TUNEL-Assay .....	28
6	<b>RNA-Isolation und quantitative real time polymerase chain reaction (qPCR) mittels TaqMan.....</b>	29
7	<b>Immunhistochemie (IHC).....</b>	33
8	<b>Bakterielle Translokation.....</b>	34
9	<b>Statistische Auswertung.....</b>	34
III	<b>Ergebnisse.....</b>	36
1	<b>Apoptose-Nachweis.....</b>	36
2	<b>Epitheliale Zell-Proliferation mittels Ki67-IHC.....</b>	37
3	<b>Expression der antimikrobiellen Peptide mBD3 und CRAMP.....</b>	38
4	<b>IgA-Sekretion der Lamina propria mononukleären Zellen (LPMZ).....</b>	39
5	<b>Bakterielle Translokation.....</b>	40
IV	<b>Diskussion.....</b>	41
1	<b>Intestinale Barrierefunktion.....</b>	42
	Epitheliale Apoptose- und Proliferations-Rate.....	42
	Antimikrobielle Peptide mBD3 und CRAMP.....	44
	IgA-Sekretion aus LPMZ.....	45
	Bakterielle Translokation.....	46
2	<b>Zusammenfassung und Ausblick.....</b>	47

<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>49</b>
<b>Danksagung.....</b>	<b>59</b>
<b>Erklärung.....</b>	<b>60</b>

**Abkürzungsverzeichnis**

ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
Ad	Adrenalin
AK	Antikörper
AVP	Arginin-Vasopressin
BSA	Bovines Serumalbumin
CED	Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen
CFU	Colony forming unit
CORT	Corticosteron
CRAMP	Cathelin-related antimikrobielles Peptid
CRH	Corticotropin Releasing Hormon
CSC	Chronic subordinate colonoy housing
CU	Colitis ulcerosa
DNAse	Desoxyribonuklease
DSS	Dextran-Sodium-Sulfat
ENS	Enterisches Nervensystem
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtOH	Ethanol
FCS	Fetales Kälberserum
fMLP	N-Formylmethionyl-Leucyl-Phenylalanin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GC	Glucocorticoid
GR	Glucocorticoid-Rezeptor
HBSS	Hank's balanced salt solution
HPA-Achse	Hypothalamo-Pituitary-Adrenal-Achse
HRP	Horseradish-Peroxidase
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
Ko	Kontrolle
LPMZ	Lamina propria mononukleäre Zellen
mBD3	Murines Betadefensin 3
MC	Morbus Crohn
MR	Mineralcorticoid-Rezeptor
NAd	Noradrenalin



---

NKZ	Natürliche Killerzelle
NNM	Nebennierenmark
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphatgepufferte Saline
PI	Propidium-Iodid
PVN	Nucleus Paraventricularis
qPCR	Quantitative Polymerasekettenreaktion
RT-PCR	Reverse Transkriptase - PCR
SEM	Standard error of the mean
SON	Nucleus Supraopticus
TdT	Terminale Desoxynucleotidyl-Transferase
TGF- $\beta$	Transforming growth factor $\beta$
T <sub>H</sub> -Zelle	T-Helfer-Zelle
TNF	Tumornekrosefaktor
VNS	Vegetatives Nervensystem
WAS	Water-Avoidance-Stress
ZNS	Zentrales Nervensystem

## I Einleitung

Jeder Organismus muss sich im Laufe seines Lebens immer wieder auf veränderte Umweltbedingungen einstellen, welche eine Störung der Homöostase mit sich bringen und somit als Stressor definiert werden. Diese Stressoren können einerseits physische (extreme Kälte oder Hitze, pathogene Infektionen u. ä.), andererseits psychische Ursachen (Fremdbestimmung, Unterordnung u. ä.) darstellen (1). Der dadurch ausgelöste Stress umfasst eine physiologische und verhaltensorientierte Antwort des Körpers, um sich diesen die Homöostase störenden Herausforderungen anpassen zu können. Jedoch kann er bei chronischer Belastung pathogen auf den Körper wirken (2, 3). So wird Stress immer wieder als möglicher negativer Einflussfaktor auf den Verlauf chronisch entzündlicher Darmerkrankungen (CED), wie Colitis ulcerosa (CU) und Morbus Crohn (MC), diskutiert (4-6). Neben den umweltbedingten Faktoren (7-9) spielt auch die genetische Prädisposition eine große Rolle (10). Ein Beispiel hierfür ist eine Variante des NOD2-Gens. NOD2 stellt einen intrazellulären Sensor für bakterielle Pathogene dar, der über die NF- $\kappa$ B induzierte Signalkaskade letztendlich zu einer Makrophagen-Aktivierung führen kann. Durch die Mutation, die gehäuft bei an MC erkrankten Patienten gefunden wurde, scheint über diesen Weg die Makrophagen-Aktivität gesenkt zu werden. Es zeigte sich im Zusammenhang mit einer homozygoten Gen-Variante eine 20-fach höhere Anfälligkeit für MC im Vergleich zu Personen mit nicht-mutiertem NOD2-Gen (11-13). Auch in Tiermodellen konnte gezeigt werden, dass bestimmte genetische Mutationen mit einem höheren Risiko, an einer entzündlichen Darmerkrankung zu erkranken, einhergehen. So konnten Maeda et al. zeigen, dass bei Mäusen mit einer zur beim Menschen gefundenen homologen Mutation im NOD2-Gen eine Dextran-Sodium-Sulfat- (DSS-) induzierte Colitis einen signifikant schwereren Verlauf hat als bei Wildtyp-Mäusen (14). Neben der genetischen Prädisposition weisen sowohl Studien am Menschen sowie an Tiermodellen darauf hin, dass die Exposition verschiedener Stressoren die Barrierefunktion des Colonepithels einschränkt sowie die Entstehung einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung (CED) begünstigt (15-18). Obwohl inzwischen ein Zusammenhang zwischen chronischem psychosozialen Stress und CED vermutet wird, sind die möglichen zugrunde liegenden Mechanismen noch unklar. So zeigte sich in früheren Studien Chronic subordinate Colony housing (CSC) als ein geeignetes Modell für

chronischen psychosozialen Stress, der körperliche Folgeerscheinungen, wie reduzierte Gewichtszunahme, vergrößerte Nebennieren, Atrophie des Thymus und eine histologisch nachweisbare spontane Colitis hervorruft. In einer dieser früheren Studien zeigte sich eine Corticosteron (CORT-) -Erhöhung bereits nach 24stündiger, jedoch der makroskopische Schaden der Darmmukosa erst nach 14tägiger CSC-Exposition (7). Diese Daten weisen auf einen Zusammenhang zwischen Stressor-Exposition, Aktivierung der Hypothalamo-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse (Hypothalamo-Pituitary-Adrenal-Achse; HPA-Achse) mit CORT-Ausschüttung und einer geschädigten Darmmukosa, die eine eingeschränkte Barrierefunktion zur Folge haben kann, hin. Untersuchung von Reber et al. (unveröffentlichte Daten) zeigen den Corticosteron-Anstieg bereits nach zehnstündiger CSC-Exposition. Aufgrund dieser Aspekte wurden in der vorliegenden Arbeit die Auswirkungen von zehnstündiger CSC-Exposition auf verschiedene physiologische und immunologische Parameter bei männlichen C57BL/6-Mäusen untersucht.

## **1 Stress**

Stress wurde erstmals 1936 von Hans Selye als unspezifische Antwort des Körpers auf jegliche Herausforderung definiert. Dabei sieht er die Reaktionen des Organismus auf einen Stressor als Zusammenspiel verschiedener Systeme des Körpers (1), durch die die lebensnotwendige Homöostase wiederhergestellt und somit die Überlebenschance des Organismus erhöht wird (9). Die Konstanzhaltung des inneren Milieus erfordert somit laufend eine Adaption an externe bzw. interne Stimuli (19). Diese Anpassungen erfolgen durch eine Aktivierung des zentralen sowie des vegetativen Nervensystems (ZNS, VNS), aber auch durch Aktivierung des endokrinen Systems. Die Folgen sind unter anderem Energiebereitstellung für Gehirn und Muskulatur durch erhöhte Herz- und Atemfrequenz, eine gesteigerte Aufmerksamkeit, Hemmung der Ruheorgane und eine verminderte Aktivität der lymphatischen Organe (9, 20, 21).

Ist diese Stress-Antwort aber dauerhaft durch chronische Stressoren aktiviert, so kann es sowohl zu körperlichen Fehlfunktionen, wie z. B. Hypertonie, Wachstumsstörungen oder auch Störungen des Gastrointestinaltrakts, als auch mentalen Schäden kommen (8, 22). Verschiedene Beobachtungen sowohl in

Studien am Menschen als auch in Tierversuchen zeigen eine Verbindung zwischen stressbelasteten Lebenssituationen und chronisch entzündlichen Darmerkrankungen auf. So konnten Salem et al. schon 1967 bei arabischen Beduinen, die aus ihrem gewohnten Umfeld in Städte umgesiedelt wurden, eine erhöhte Anfälligkeit für CU zeigen (23). Auch in Tierversuchen konnte chronischer Stress mit sowohl psychischen als auch physischen Schäden in Verbindung gebracht werden (5, 24-26).

Zum Beispiel zeigten Reber et al. 2006 in ihrer Studie, dass männliche C57BL/6 Mäuse, die einer 19tägigen intermittierenden social defeat- (2h ein- bzw. zweimal täglich)/ overcrowding (24h)-Stresssituation ausgesetzt waren, eine schwerwiegendere Dextran-Sulfat-Natrium (DSS)-induzierte Colitis entwickelten sowie eine schlechtere Regeneration aufwiesen, gezeigt durch verminderte Überlebensraten, als nicht-gestresste Kontrolltiere (27). Des Weiteren konzipierten Reber et al. 2007 das CSC-Modell als chronischen Stressor, der chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED) in männlichen C57BL/6 Mäusen auslöst (7). Einen Zusammenhang zwischen chronischen psychologischen Stressoren und einer gestörten Barrierefunktion des Gastrointestinaltrakts, die sich in erhöhter Ionensekretion, Permeabilität für Ionen und Makromoleküle sowie einer vermehrten Interaktion von Bakterien mit Epithelzellen der Colon-Mukosa widerspiegelte, fanden Cameron et al. 2005 an männlichen BALBc Mäusen. Als Stressor wurde hierbei das Water-Avoidance-Stressmodell (WAS; 1h täglich an zehn aufeinander folgenden Tagen) verwendet (18).

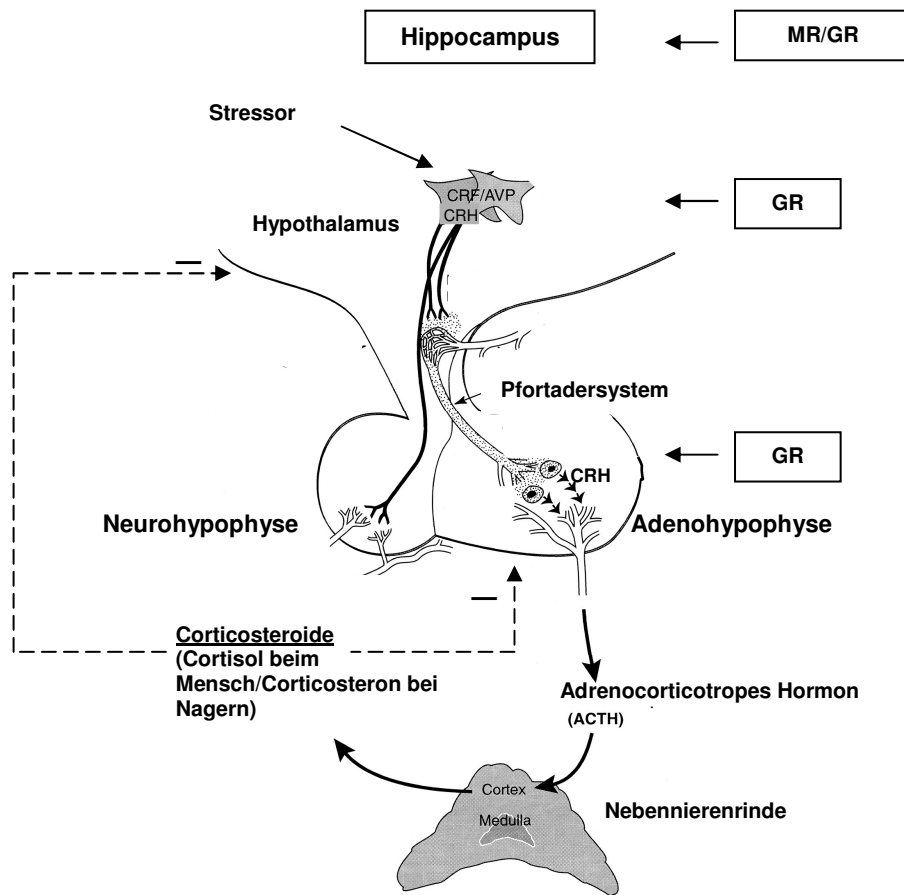
### **1.1 Akuter Stress**

Jeder Organismus ist im Laufe seines Lebens immer wieder unterschiedlichsten Stresssituationen ausgesetzt. Meist ist die Stress-Exposition aber nur von kurzer Dauer, und die darauf folgende Reaktion hilft dem Körper die Homöostase wieder herzustellen. Diese minuten- bis stundenlange Exposition bezeichnet man als akuten Stressor, die Reaktion des Körpers als akuten Stress. Die dadurch ausgelöste Stress-Reaktion ist überlebenswichtig (9). Dabei kommt es zur Aktivierung verschiedener Systeme im Körper wie der HPA-Achse (siehe 2.1) und des vegetativen Nervensystems (siehe 2.2), die diesen auf die sog. fight-or-flight-Reaktion vorbereiten. Nach Abklingen der Stressors werden die aktivierten Systeme des Körpers wieder deaktiviert (28).

### 1.1.1 Hypothalamo-Pituitary-Adrenal – Achse (HPA-Achse)

Wenn die Homöostase eines Organismus durch einen Stressor gestört wird, kommt es innerhalb weniger Minuten zu einer endokrinen Stressantwort. Das dabei hauptsächlich involvierte System des Körpers ist die HPA-Achse (29-31). Der Hypothalamus, der den Boden des Diencephalon bildet, dient als das übergeordnete Zentrum der HPA-Achse. Werden dort die parvocellulären Neurone des Nucleus paraventricularis (PVN) akut stimuliert, produzieren sie sowohl Corticotropin Releasing Hormon (CRH) als auch zu einem sehr geringen Anteil Arginin-Vasopressin (AVP). Diese Neuropeptide gelangen über die Axone der neurosekretorischen Zellen zur Eminentia mediana und werden von dort über das thalamisch-hypophysäre Pfortadersystem zur Adenohypophyse befördert. In der Adenohypophyse werden die corticotrophen Zellen hauptsächlich durch CRH zur Produktion und Freisetzung von adrenocorticotropem Hormon (ACTH) angeregt (32-34), ein Effekt, der vor allem bei chronischem Stress von AVP verstärkt wird (19). ACTH wiederum gelangt durch den Blutstrom zur Nebennierenrinde, wo es die Produktion und Sekretion von Corticosteron (CORT) (Nager) bzw. Cortisol (Mensch) bewirkt (Abb. 1). Diese sog. Glucocorticoide (GC) sind die physiologisch wirksamen Hormone der HPA-Achse, die im Körper zirkulierend unter anderem die Energiebereitstellung und Immunfunktionen regulieren (19, 31, 33, 34).

Da GC lipophile Steroidhormone sind, können sie ungehindert die Blut-Hirn-Schranke passieren und so die HPA-Achse über einen negativen Feedback-Mechanismus regulieren, indem sie in Wechselwirkung mit den CRH-sezernierenden Zellen des Hypothalamus sowie mit den ACTH-produzierenden Zellen der Adenohypophyse stehen (34). Bei diesem Vorgang sind intrazelluläre Glucocorticoid (GR)- und Mineralocorticoid-Rezeptoren (MR) involviert. Diese beiden Rezeptortypen unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Lokalisation (Abb. 1) und Affinität gegenüber GC und den dadurch vermittelten Effekten auf körpereigene negative Feedback-Systeme (35). Bei basalen GC-Konzentrationen werden vor allem die höher GC-affinen MR gebunden und aktiviert, die sich hauptsächlich im Hippocampus befinden und für die Aufrechterhaltung der Erregbarkeit der Neurone verantwortlich sind. Bei ansteigender GC-Konzentration werden die GR im Hippocampus, Hypothalamus und in der Adenohypophyse aktiviert und unterdrücken daraufhin den Output der sezernierenden Neurone im Hypothalamus und der Adenohypophyse (31, 36), wodurch letztendlich die Corticosteron-Produktion und -Sekretion wieder reduziert werden.



**Abb. 1:** Schematische Darstellung der HPA-Achse: Corticotropin Releasing Hormon (CRH) und Arginin-Vasopressin (AVP) werden aus dem Hypothalamus in das thalamisch-hypophysäre Pfortadersystem entlassen. Nach Bindung an ihre spezifischen Rezeptoren auf den corticotrophen Zellen in der Adenohypophyse kommt es zur Sezernierung von adrenocorticotropem Hormon (ACTH). ACTH gelangt zur Nebennierenrinde, wo es die Produktion und Freisetzung von Cortisol (Mensch) bzw. Corticosteron (Nager) stimuliert. Diese regulieren die HPA-Achse auf verschiedenen Ebenen durch negatives Feedback. Adaptiert nach Turnbull et River (37)

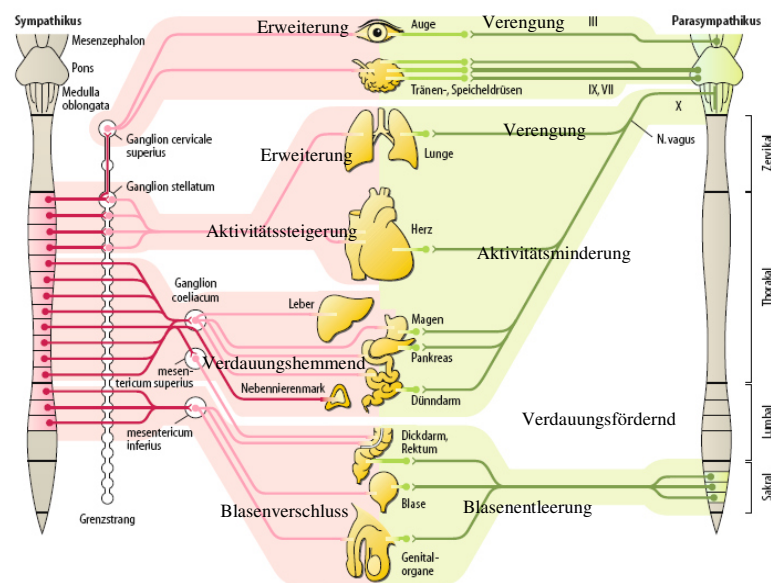
### 1.1.2 Das Vegetative Nervensystem (VNS)

Das Vegetative Nervensystem setzt sich aus dem sympathischen, parasympathischen und enterischen Nervensystem zusammen und innerviert afferent und efferent vor allem die glatte Muskulatur der Eingeweide und Gefäße sowie die endokrinen und exokrinen Drüsen. Es wird unter anderem durch

Stressoren, die auch die HPA-Achse (siehe 2.1) aktivieren, beeinflusst und steuert dadurch vegetative Parameter (38).

### Der Sympathikus und der Parasympathikus

In ihrer Entwicklung haben Sympathikus und Parasympathikus jeweils unterschiedliche Ursprünge aus der Neuraxis. Die präganglionären Neurone des Sympathikus entspringen dem Thorakal- sowie dem Lumbal-Mark, die des Parasympathikus dem Hirnstamm und dem Sakralmark. Die postganglionären Neurone des Sympathikus liegen paravertebral in den Grenzsträngen bzw. prävertebral in den Bauchganglien (Abb. 2), die des Parasympathikus in organnahen Ganglien.



**Abb. 2:** Schematischer Aufbau des Sympathikus und Parasympathikus: Dunkelrote bzw. dunkelgrüne Linien entsprechen präganglionären Nervenfasern. Hellrote bzw. hellgrüne Linien entsprechen postganglionären Fasern. Adaptiert nach Schmidt, Lang, Thews (39).

Die Wirkung von Sympathikus und Parasympathikus auf die Erfolgsorgane ist in der Regel antagonistisch. Der Sympathikus führt bei Aktivierung einerseits zu gesteigerter Aufmerksamkeit, Herzfrequenzsteigerung, Bronchodilatation, Pupillenerweiterung und hemmt andererseits gastrointestinale Sekretions- und

Motilitätsvorgänge. Im Gegensatz dazu fördert der Parasympathikus diejenigen Körperfunktionen, die in „Ruhephasen“ aktiv sein sollten, wie z. B. die Verdauung. Noradrenalin (NAd) wird bei Sympathikus-Aktivierung aus peripheren sympathischen Nervenendigungen ausgeschüttet, wohingegen Adrenalin (Ad) hauptsächlich aus dem Nebennierenmark (NNM) sezerniert wird. Das NNM kann als sympathisches Paraganglion gesehen werden, da es aus der Neuralleiste, d. h. der Anlage des Grenzstranges, entsteht und sich somit aus einer Anhäufung postganglionärer sympathischer Neurone zusammensetzt. Im prä- und postganglionären parasympathischen System findet sich als Transmitter Acetylcholin, sezerniert aus allen präganglionären sowie aus postganglionären parasympathischen Nervenendigungen. Die Neurotransmitter, die die jeweilige Wirkung an dem Effektororgan vermitteln, sind im Fall des Sympathikus Noradrenalin (NAd) und in geringem Maße Adrenalin (Ad), im Fall des Parasympathikus Acetylcholin (39).

## **1.2 Chronischer Stress**

Ist der Organismus einem Stressor chronisch ausgesetzt, sind, wie bereits erwähnt, die Stress-Systeme dauerhaft aktiviert. Letztendlich übt die Stress-Antwort größeren Schaden auf den Organismus aus als der Stressor selbst (9). So konnten Levenstein et al. in ihrer prospektiven Kohortenstudie über 68 Monate mit 62 CU-Patienten feststellen, dass Patienten, die in diesem Zeitraum subjektiv chronischen Stresssituationen ausgesetzt waren, eine nachweisbare Verschlimmerung der Erkrankung erlitten (40). Auch tierexperimentelle Studien zeigen viele physiologische, aber auch psychische Veränderungen nach dauerhafter Stress-Exposition auf. Dazu gehören unter anderem eine verminderte Gewichtszunahme, Hypertrophie der Nebennieren, Atrophie des Thymus (7, 24, 41, 42), die Entstehung spontaner Colitis (7, 27), sowie erhöhtes Angst- und depressionsähnliches Verhalten (25, 26). Diese negativen Veränderungen sowohl in physischer als auch in psychischer Hinsicht wirken sich nicht bei jedem Individuum gleich aus. Dies hängt von der Art des Stressors, von der genetischen Prädisposition, vom Entwicklungsstadium sowie von verschiedenen Umweltfaktoren ab (43, 44). Gerade in wichtigen Entwicklungsphasen bei Kindern



kann chronischer Stress z. B. zu Wachstumsstörungen führen, dem sog. psychosozialen Minderwuchs (45).

In dieser Studie werden unterschiedliche Auswirkungen von zehnstündigem Stress anhand des von Reber et al. etablierten CSC-Modells (7) an männlichen C57BL/6-Mäusen untersucht. Dieses Stressmodell beinhaltet auch die psychosozialen Aspekte einer dauerhaften Stress-Belastung.

## **2 Stress und chronisch-entzündliche Darmerkrankungen (CED)**

### **2.1 Auswirkungen von Stress auf die intestinale Barrierefunktion**

Der Verdauungskanal ist in seiner gesamten Länge lumenwärts durch intestinale Epithelzellen ausgekleidet. Diese Zellen erfüllen eine Reihe von Funktionen: Zum einen dienen sie der Verdauung, Resorption von Nahrung, zum anderen stellen sie die wichtigste Barriere des Körpers zwischen „innen und außen“ dar. Diese Barrierefunktion wird durch verschiedene Mechanismen erreicht; die Epithelzellen sind untereinander durch tight junctions verbunden, so dass der trans- und parazelluläre Transport reguliert werden kann. Mazzon et al. stellten einen Zusammenhang zwischen zweistündiger Immobilisations-Stressprozedur, induzierter Colitis und der Funktion der tight junctions im Ileum von C57BL/6 Mäusen her. Dabei konnten sie nachweisen, dass Struktur und Funktion der tight junctions nach der Stress-Exposition in Abhängigkeit von erhöhter proinflammatorischer Zytokin-Sekretion und somit die intestinale Barrierefunktion beeinträchtigt war (46). In einer früheren Studie bewiesen sie bereits die veränderte Funktionsfähigkeit der tight junctions aufgrund Dinitrobenzoesäure - induzierter Colitis (47).

Ein weiterer Mechanismus, der für die Barrierefunktion des intestinalen Epithels verantwortlich ist, ist die Lebensdauer und Proliferation der Epithelzellen. Ausdifferenzierte Zellen des Darm-Epithels haben eine Lebensdauer von ca. fünf Tagen. Am Kryptengrund sitzen undifferenzierte Stammzellen, die sich regelmäßig teilen, die Kryptenwand aufwärts wandern und sich bis zum Erreichen der Kryptenmündung zu Enterozyten bzw. Becherzellen differenzieren. Nach drei bis fünf Tagen erfolgt der programmierte Zelltod, die Apoptose. Dieser Mechanismus erlaubt eine ständige Erneuerung des intestinalen Epithels und somit eine

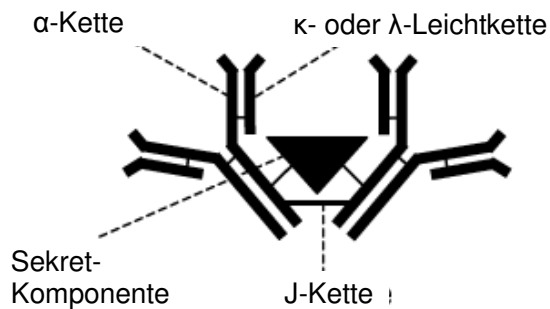
Aufrechterhaltung der Barrierefunktion (48). So konnten Boudry et al. 2007 an Brown Norway background Ratten zeigen, dass chronisch psychische Stress-Belastung (Water-Avoidance-Stress, 1h täglich an fünf bzw. zehn aufeinander folgenden Tagen) Veränderungen des Ileum-Epithels hervorruft. Dabei fanden sie zum einen eine erhöhte Apoptose-Rate nach fünftägiger, zum anderen eine erhöhte Proliferationsrate in den Krypten sowohl nach fünf- als auch nach zehntägiger Stress-Prozedur. Des Weiteren wiesen sie eine erhöhte Permeabilität des Epithels für Makromoleküle nach, gemessen an der Leitfähigkeit für Horseradish Peroxidase (HRP; ein Makromolekül, das bei Flux-Studien eingesetzt wird) (49).

## **2.2 Auswirkungen von Stress auf die intestinale Immunfunktion**

Es gibt inzwischen zahlreiche Studien, die zeigen konnten, dass der Gastrointestinal-Trakt nicht ausschließlich zur Verdauung und Resorption vom Körper benötigt wird, sondern auch eine wichtige Immunfunktion darstellt und zur Abwehr von Noxen dient (4, 50).

### **2.2.1 Immunglobulin A**

Das Darm-Epithel sezerniert Flüssigkeit und Mukus ins Lumen, der sekretorisches Immunglobulin A (IgA) enthält, wodurch schädliche Substanzen gelöst, entfernt oder gebunden werden können (48). Antikörper der Klasse IgA werden auf allen schleimproduzierenden Oberflächen sezerniert und sind Teil des darmeigenen Immunsystems gegen eindringende, potenziell schädliche Erreger wie Viren, Bakterien, oder parasitäre Mikroorganismen. Die homodimeren IgAs sowie die Joining-Peptide zur Dimerisierung der IgAs (Abb. 3) werden von mukosaständigen Plasmazellen der Lamina propria unter dem Einfluss diverser Zytokine produziert und über Transzytose ins Darmlumen sezerniert. Dort schützt es die Mukosa durch seine Pathogen-neutralisierende und -blockierende Wirkung vor dem Eindringen der schädlichen Antigene (39).



**Abb. 3:** Vereinfachte Darstellung eines sekretorischen IgA-Dimers: Es besteht aus jeweils zwei  $\alpha$ -Ketten (über eine Disulfidbrücke verbunden),  $\kappa$ - oder  $\lambda$ -Ketten (über eine Disulfidbrücke mit den  $\alpha$ -Ketten verbunden), dem Joining-Peptid und einem Glykoprotein (Sekretkomponente) (51).

### 2.2.2 Antimikrobielle Peptide

Eine weitere Komponente dieser intestinalen Barriere ist die Sekretion antimikrobieller Peptide durch das Epithel, vor allem aus den Paneth-Körnerzellen des Dünndarms, aber auch aus Immunzellen des angeborenen Immunsystems. Diese Peptide sind kleine Proteine, die von allen eukaryotischen Zellen zur Abwehr von Pathogenen genutzt werden und bei Säugern in zwei Hauptklassen eingeteilt werden können: Defensine und Cathelicidine (52).

Das in der vorliegenden Studie untersuchte murine Betadefensin 3 (mBD3) gehört in die Familie der Defensine. Diese sind kationische Peptide mit einem Molekulargewicht von 3-5 kDa, deren Gensequenz sowohl bei der Maus als auch beim Menschen auf Chromosom 8 lokalisiert ist. Dies beruht vermutlich auf einer hohen Konservierung im Laufe der Evolution (53). Diese endogenen Antibiotika besitzen ein breites Spektrum an antimikrobiellen Eigenschaften sowohl gegen Gram-negative als auch gegen Gram-positive Bakterien, wobei einige der Defensine auch eine Abwehrfunktion gegenüber Pilzen, Viren und Protozoen besitzen. Bei den humanen Defensinen wurden bisher sechs Alpha- und vier Beta-Defensine identifiziert, wobei die  $\alpha$ -HBD1-4 in Granulozyten,  $\alpha$ -HBD 5 und 6 in intestinalen Paneth-Zellen synthetisiert werden.  $\beta$ -Defensine haben ihren Ursprung vor allem in Epithelien (Haut, Lunge, und Intestinaltrakt) (54). Zusätzlich zu ihrer antibiotischen Wirkung konnte eine chemotaktische Wirkung der Defensine auf Effektorzellen des adaptiven Immunsystems sowie eine Immunantwort verstärkende Wirkung gezeigt werden (55-57). Ähnlich wie auch andere kationische antimikrobielle Peptide, töten Defensine Pathogene ab, indem sie deren Membran mittels des als „Shai-Matsuzaki-Huang-Modell“ (58) bekannten

Mechanismus zerstören. Hierbei interagieren die membranaktiven Moleküle, in diesem Fall die Defensine, mit der lipophilen Kopfgruppe der Membran-Phospholipide und führen durch eine Neuausrichtung der Moleküle zur Porenbildung und somit Zerstörung des Pathogens (58).

Ein weiteres antimikrobielles Peptid, das in der vorliegenden Arbeit untersucht wurde, ist das Cathelin-related antimikrobielle Peptid (CRAMP) aus der Familie der Cathelicidine. Diese sind Propeptide mit einer hoch-konservierten N-terminalen Domäne (Cathelin = Cathepsin L Inhibitor) und einer variablen antimikrobiell wirksamen C-terminalen Domäne (59). Es wurden 35 Cathelicidine aus verschiedenen Säugetieren identifiziert, jedoch konnte bislang beim Menschen nur ein Cathelicidin nachgewiesen werden, das LL-37/hCAP-18 (60). Ähnlich den Defensinen wirken Cathelicidine bakterizid gegen Gram-positive und Gram-negative Bakterien, indem sie mit der Lipidmembran des Mikroorganismus interagieren. Dabei erfolgt die Interaktion jedoch erst nach Aktivierung des in spezifischen Vesikeln gespeicherten Propeptids durch proteolytische Spaltung mittels der Protease 3, wobei das antimikrobiell aktive C-terminale Peptid entsteht (61, 62). Neben der antibiotischen Wirkung konnten Kurosaka et al. 2005 humorale und zelluläre Immunantwort fördernde Eigenschaften von CRAMP nachweisen (63).

Psychologische Stressoren, sowohl akut als auch chronisch, stören, wie in diversen tierexperimentellen Studien mehrfach gezeigt wurde, die oben beschriebene intestinale Barrierefunktion (64-66). So konnten z.B. Santos et al. (67) einen Zusammenhang zwischen Stress-Exposition, der HPA-Achse, und einer beeinträchtigten intestinalen Barriere herstellen. Dabei fanden sie heraus, dass bei aus Wistar-Kyoto Ratten isolierten Colon-Segmenten nach einer zweistündigen Stress-Exposition (cold restraint-Stress) eine erhöhte Leitfähigkeit sowie Permeabilität für HRP sowie das bakterielle chemotaktische Peptid N-Formylmethionyl-Leucyl-Phenylalanin (fMLP; Chemotaxis von neutrophilen Granulozyten und Monozyten) auftrat. Dieser Effekt konnte mit einer CRH-Injektion ausgelöst und mit einer CRH-Antagonist-Injektion gehemmt werden, was auf eine Beteiligung des CRH-Systems auf den Stressinduzierten Zusammenbruch der intestinalen Barrierefunktion hinweist.

### 2.3 Stress und Colitis ulcerosa (CU)

Zu den chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen gehören zum einen Colitis ulcerosa (CU), zum anderen Morbus Crohn (MC). Bei der CU zeigt sich ein entzündlicher Befall, der auf das Rektum und das Colon beschränkt ist, und sich, anders als beim MC, kontinuierlich von anal nach oral ausschließlich in der Mukosa und Submukosa ausbreitet. Die Patienten leiden unter rezidivierenden Diarrhoen, Darmblutungen und Koliken sowie extraintestinalen Manifestationen. Die Ursachen dieser entzündlichen Prozesse sind noch nicht geklärt. Man nimmt an, dass verschiedene Faktoren, die einerseits eine genetische Prädisposition, andererseits aber auch umweltbedingte Faktoren beinhalten, zum Ausbruch führen (68). Franke et al. identifizierten kürzlich in einer systematischen Genomdeckenden Analyse mit 1.167 CU Patienten und 777 gesunden Patienten Sequenzvarianten, unter anderem am Interleukin-10 (IL-10)-Genlocus bei erkrankten Personen (69). Gearry et al. identifizierten in einer Populationsbasierten Fall-Kontroll-Studie mit 653 CU Patienten und 600 gesunden Patienten diverse umweltbedingte Risikofaktoren, wie zum Beispiel das Heizen mit Kohle sowie die Wohnsituation, in der man aufwächst (ohne Garten) (70). Die Erkrankung ist durch eine überschießende Aktivierung des intestinalen Immunsystems bedingt, die letztendlich zu einer Zerstörung der Mukosa führen kann. Diskutiert wird eine zugrunde liegende Überreaktion auf Bakterien und bakterielle Bestandteile der Darmflora. Zu einer Krankheitsaktivierung können möglicherweise auch chronische Stressbelastungen führen, worauf verschiedene Studien und Patientenbefragungen hinweisen (71, 72). Man geht davon aus, dass der Entzündungsprozess des Colons bei diesem Krankheitsbild vor allem durch Zytokine aus T-Helfer-(T<sub>H</sub>2-)Zellen (z. B. IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13) vermittelt wird, allerdings spielen auch Zytokine wie TNF und IL-6 eine wichtige Rolle. Dabei erhöht Stress die Ausschüttung dieser proinflammatorischen Zytokine und verstärkt somit die Schädigung der Mukosa (50). So konnten León et al. mittels Untersuchungen an Darmgewebe von an CU erkrankten Patienten zeigen, dass proinflammatorische Zytokine (IFN $\gamma$ , TNF, IL-6, IL-18, IL-15, IL-23) sowohl in befallenen als auch nicht befallenen Arealen erhöht waren, sowie, dass eine Korrelation zwischen erhöhter Zytokin-Freisetzung (IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-12, IL-27) und Schädigung des intestinalen Gewebes besteht (73).

## 2.4 Stress und Morbus Crohn (MC)

Beim MC hingegen handelt es sich um eine chronische, zum Teil granulomatöse Entzündung des gesamten Magen-Darm-Trakts, die sich aber vorwiegend im terminalen Ileum sowie Colon findet. Charakteristisch sind der diskontinuierliche und segmentale Befall sowie das Auftreten von Fisteln und Stenosen. Zu den Symptomen, unter denen MC Patienten leiden, gehören Diarrhoen, Übelkeit, Erbrechen, starke Schmerzen, Erschöpfung und / oder Fieber. Auch finden sich häufig extraintestinale Manifestationen, wozu unter anderem Arthralgien oder Hautveränderungen wie Erythema nodosum oder Pyoderma gangraenosum gehören. Auch beim MC sind die Ursachen der Krankheitsentstehung nicht geklärt. Ebenfalls scheinen genetische Prädisposition, aber auch andere Faktoren eine Rolle zu spielen. Es konnte gezeigt werden, dass z. B. Rauchen einen negativen Effekt auf den Ausbruch bzw. Verlauf der Erkrankung hat (74). Allerdings werden auch psychische Belastungen und chronisch empfundener Stress als mögliche Ursachen eines Ausbruchs diskutiert: In einer der ersten Querschnitts-Studien fanden Cohn et al. 1970 eine starke Korrelation zwischen psychischer Belastung und einem negativen Krankheitsverlauf heraus (75). Auch neuere Studien zeigen diesen Zusammenhang, wie z. B. die Longitudinalstudie von Mardini et al. 2004. Hierbei fand man eine starke Assoziation zwischen subjektiv empfundenen Stresssituationen, Depression und einem schlechteren Krankheitsverlauf heraus, indem 18 MC Patienten prospektiv über einen Zeitraum von 2 Jahren, in Intervallen von 8-12 Wochen beobachtet wurden (76).

Im Gegensatz zu CU wird die Entzündung bei MC vor allem über T<sub>H</sub>1-Zellen vermittelt. Diese CD4<sup>+</sup>-Lymphozyten sezernieren proinflammatorische Zytokine wie TNF, IFN- $\gamma$ , IL-12, und IL-18. Es konnte im Tiermodell gezeigt werden, dass unter Stress das entzündungsfördernde TNF vermehrt, das entzündungshemmende TGF- $\beta$  vermindert ausgeschüttet wird (50).

## 3 Zielsetzung

Das von Reber et al. (7) beschriebene Modell für chronisch psychosozialen Stress ist der natürlichen Lebensweise von Mäusen in Kolonien sehr ähnlich. Hierbei werden vier männliche Mäuse mit einem schwereren und aggressiveren Männchen an 19 aufeinander folgenden Tagen in einer Kolonie gehalten. Dabei

kommt es zur Ausbildung einer Hierarchie, die für die von dem größeren Männchen dominierten und dadurch subordinierten Tiere einen dauerhaften und psychosozialen Stressor darstellt. So fanden Reber et al. (7) heraus, dass die CSC-Exposition zunächst (bereits an Tag 2) zu erhöhtem Plasma-CORT-Spiegel und letztendlich zu Schäden der Colon-Mukosa führt. Unveröffentlichte Daten von Reber et al. zeigen diese erhöhte Plasma-CORT-Konzentration schon nach zehnstündiger CSC-Exposition.

Basierend auf der bekannten Colitisinduzierenden Wirkung einer CSC-Exposition und den Zusammenhängen zwischen psychosozialem Stress und chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen bei Mensch und Tier (27, 50), ist das Ziel dieser Arbeit, einige dieser Stressabhängigen Mechanismen, die eine intestinale Entzündung begünstigen könnten, anhand des etablierten Modells in männlichen C57BL/6-Mäusen zu identifizieren. Daher wurden verschiedene Parameter, die zu einer Veränderung der mukosalen Barriere und damit zu einer intestinalen Entzündung führen könnten, untersucht. Dazu wurden zuerst epitheliale Parameter, wie die Apoptose- sowie die Proliferations-Rate des Colon-Epithels, gemessen. Für die Messung der Apoptose der Epithelzellen wurden zwei unterschiedliche Methoden (Caspase-III-Aktivitäts-Messung und TUNEL-Assay) angewandt. Die epitheliale Proliferations-Rate wurde mittels des Proliferationsmarkers Ki67 immunhistochemisch untersucht. Um anschließend die Sekretion antimikrobieller Peptide und des IgAs im Colon, die weitere Schutzmechanismen des Darmes gegenüber Pathogenen darstellen, untersuchen zu können, wurde zum einen die quantitative PCR (qPCR), die die Genexpression des Defensins mBD3 und des Cathelicidins CRAMP maß, zum anderen das ELISA-Verfahren verwendet, mit dem Veränderungen der Sekretion des IgAs in Lamina propria mononukleären Zellen aufgrund der Stressexposition untersucht werden sollten. Abschließend wurden die durch den Stress vermutete herabgesetzte Barrierefunktion und erhöhte Permeabilität für Mikroorganismen überprüft, indem die Translokation von Keimen der luminalen Flora ins Colongewebe sowie in mesenteriale Lymphknoten quantitativ bestimmt wurde.

## **II Material und Methoden**

### **1 Versuchstiere**

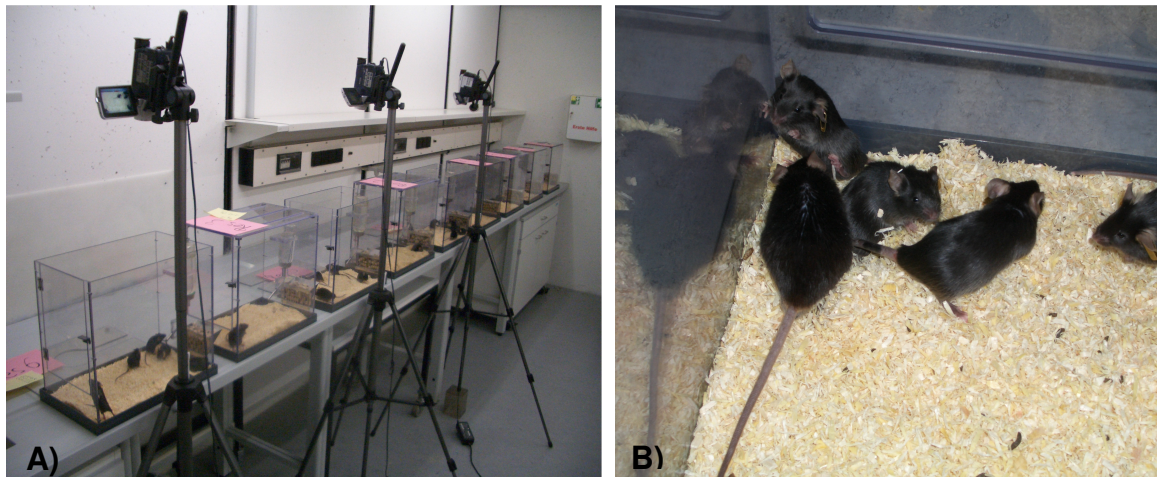
Männliche C57BL/6-Mäuse wurden in einem Alter von 36 bis 45 Tagen und einem Gewicht von 19 bis 21g von Charles River (Sulzfeld, Deutschland) bezogen. Die Tiere wurden vor der CSC-Exposition mindestens sieben Tage in Einzelkäfigen (16 x 22 x 14cm) unter Standardbedingungen gehalten (Licht-/ Dunkelzyklus 12/12 Stunden; Temperatur:  $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ; Luftfeuchtigkeit ca. 40 %). Zugang zu Futter und Wasser erfolgte ad libitum.

Des Weiteren wurden männliche Mäuse (C57BL/6) mit einem Gewicht von 30 bis 35g eingesetzt, um in der jeweiligen Kolonie die dominante Position einzunehmen. Diese Männchen wurden vor Beginn der CSC-Exposition bezüglich ihrer Aggressivität getestet und trainiert. Bissige Tiere und somit Verletzungen bei den subordinierten Mäusen konnten dadurch vor den eigentlichen Versuchen ausgeschlossen werden.

### **2 Chronisch-subordinierte Koloniehaltung (chronic subordinate colony (CSC) housing)**

Wie bereits bei Reber et al. (7, 27) mehrfach beschrieben, löst eine 19tägige subordinierte Koloniehaltung (CSC, siehe unten) eine spontane Colitis aus. Chronisch psychosozialer Stress wird dabei durch eine 19tägige subordinierte Koloniehaltung induziert, welche in dieser Arbeit durch den dafür bereits geprägten Begriff „chronic subordinate colonyhousing“ – abgekürzt CSC housing – bezeichnet wird (7). Dabei werden bei Versuchsbeginn (Tag 1) je vier Tiere mit einem großen und aggressiven Männchen in einem Plexiglas-Beobachtungskäfig (38 x 22 x 35cm) zusammengesetzt (Abb. 4). Die ersten 30 min einer derartigen Koloniebildung werden dabei auf Video aufgezeichnet und anschließend ausgewertet. So wird sichergestellt, dass die Versuchstiere von dem schwereren und aggressiveren Männchen dominiert werden und aufgrund ihrer unterlegenen Position chronischem Stress ausgesetzt sind. Um Gewöhnungseffekte ausschließen zu können, werden die dominanten Männchen an den Tagen 8 und 15 ausgetauscht. Verglichen werden diese chronisch gestressten CSC-Mäuse mit Kontrolltieren (Ko), die während der 19 Tage CSC-Exposition einzeln gehalten (16 x 22 x 14cm) und, außer dem wöchentlichen Käfigwechsel, nicht gestört werden.





**Abb. 4:** Chronisch-subordinierte Koloniehaltung: (A) Vier männliche Mäuse wurden mit einem schwereren und aggressiveren Männchen in einem Plexiglas-Beobachtungskäfig zusammengesetzt. Die ersten 30 min der Koloniebildung wurden auf Video aufgezeichnet und ausgewertet. (B) Subordinierte Mäuse während der CSC-Exposition.

### 3 Experimenteller Ablauf und Organentnahme

Das CSC-Modell wurde, wie oben beschrieben, als chronisch psychosozialer Stressor eingesetzt. Die Mäuse wurden gewogen und willkürlich in eine CSC- und eine Kontrollgruppe eingeteilt. Um die akuten Effekte dieses psychosozialen Stressors auf die epitheliale Barrierefunktion und die bakterielle Translokation in verschiedene Gewebe und deren Mechanismen im Detail zu klären, wurden die Tiere einer zehnstündigen CSC-Haltung exponiert und im Anschluss daran getötet. Nach der Dekapitation wurden den Tieren Colon sowie mesenteriale Lymphknoten entnommen, vom Fettgewebe befreit und gewogen.

### 4 Isolation/Inkubation der intestinalen Epithelzellen sowie der Lamina propria mononuklären Zellen (LPMZ)

Um die intestinalen Epithelzellen sowie die Lamina propria mononuklären Zellen isolieren zu können, wurden die Dickdärme aller Tiere einer Gruppe entnommen, der Länge nach aufgeschnitten, mit kaltem PBS (Phosphat gepufferte Saline) mehrere Male gewaschen und 30 min bei 37°C mit HEPES-Medium (RPMI-1640, angereichert mit 2% einer 1M HEPES-Lösung [Roth, Karlsruhe, Deutschland], 2% fetalem Kälberserum [FCS, Biochrom, Berlin, Deutschland], 100U/ml Penizillin und 100µg/ml

Streptomycin [GIBCO-BRL, Eggenstein, Deutschland]) inkubiert. Es wurden Gewebestücke (maximal 2,5 Därme pro Falcon) einer Behandlungsgruppe (CSC bzw. Ko) bei der weiteren Verarbeitung zusammengefasst. Die Epithelzellen wurden abgetrennt, indem das Darmgewebe in 50ml-Falcons (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) 20 sec lang in 20ml HEPES-Medium kräftig geschüttelt und anschließend durch ein Sieb gegeben wurde. Dieser Schritt erfolgte drei Mal. Das dabei gesammelte Medium wurde bei 1500U/min und 4°C 15 min lang zentrifugiert. Danach erfolgte ein Waschschriff in kaltem PBS. Die Epithelzellen, die für die Caspase-III-Aktivitäts-Messung verwendet werden sollten, wurden in 1ml eiskaltem Lysis-Puffer (10mmol/l HEPES [Roth, Karlsruhe, Deutschland], 1% Saccharose, 0,01% 3-((3-Cholamidopropyl) Dimethylammonio)-1-Propan-Sulfonat, 1mmol/l Phenylmethyl-Sulfonyl-Fluorid (CHAPS), 0,1mmol/l Dithiothreitol (DTT), 1mmol/l Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> und eine Tablette des vollständigen Proteinase-Inhibitor-Cocktails [Roche, Mannheim, Deutschland]) gelöst. Anschließend wurden die Zellsuspension 10 sec lang auf Eis sonifiziert, 10 min lang bei 4°C mit 1300U/min zentrifugiert und die Zellen enthaltenden Überstände bei -20°C gelagert.

Das nach dem Herauswaschen der Epithelzellen restliche Darmgewebe wurde in Hanks's balanced salt solution (HBSS, ohne Calcium und Magnesium; Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) mit 2mM Ethylendiamin-Tetraessigsäure (EDTA; Sigma Aldrich, Deisenhofen, Deutschland) 20 min lang bei 37°C auf dem Magnetrüttler inkubiert. Daraufhin wurde das Darmgewebe erneut mit HBSS ohne EDTA zu oben erwähnten Bedingungen inkubiert, anschließend kurz mit HEPES-Medium gewaschen und mittels einer Schere homogenisiert. Das zerkleinerte Gewebe wurde nun 90 min lang mit angereichertem RPMI-1640 bei 37°C gerührt, das 20% FCS (Biochrom, Berlin, Deutschland), 1mg/ml Kollagenase Typ I (=336U/ml, Sigma Aldrich, Deisenhofen, Deutschland), 0,3mg/ml Desoxyribonuklease (DNase I; Roche, Mannheim, Deutschland), sowie 2mg/ml Hyaluronidase (Sigma Aldrich, Deisenhofen, Deutschland) enthielt. 10 min vor Ablauf der Zeit wurde dem Ansatz 2mM EDTA zugegeben. Nach erneuter Homogenisierung wurde der Verdau abgestoppt, indem Zellkultur-Medium (RPMI-1640 mit 10% FCS [Biochrom, Berlin, Deutschland], 100U/ml Penizillin und 100µg/ml Streptomycin [GIBCO-BRL, Eggenstein, Deutschland] und 0,03mM β-Mercaptoethanol [Sigma Aldrich, Deisenhofen, Deutschland]) dazugegeben wurde. Im Anschluss daran wurde das Homogenat mittels eines 70µm Cell-Strainer (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) filtriert. Danach wurden die mononuklären Zellen unter Zuhilfenahme einer Dichte-

Zentrifugation mit 66%igem Percoll-Trenn-Medium (Sigma Aldrich, Deisenhofen, Deutschland) isoliert. Die sich in der Interphase befindenden Zellen wurden vorsichtig abgenommen, mit Zellkultur-Medium (RPMI-1640) gewaschen, für die Lebendzellzahl-Bestimmung mit Trypanblau versetzt und mittels einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Daraufhin wurden  $2 \cdot 10^5$  Zellen pro 200  $\mu$ l in eine 96-Well-Platte für die IgA-Quantifizierung transferiert. Das sezernierte IgA wurde mittels des ELISA-Kits für IgA (Bethyl Laboratories Inc., Montgomery, TX, USA) bestimmt.

Zunächst wurden die 96-Well-Platten mit je 100  $\mu$ l verdünntem Antikörper (1:100; in Coating Puffer [0,5mM Carbonat-Bicarbonat, pH 9,6]) 60 min lang bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden sie fünfmal mit Wasch-Lösung (50mM TBS, pH 8,0, 0,05% Tween 20) gewaschen. Danach wurde jedes Well mit 200  $\mu$ l blocking-Lösung (postcoat-Lösung; 50mM TBS, pH 8, 1% BSA) gefüllt und 30 min lang bei Raumtemperatur inkubiert und danach erneut mit der Wasch-Lösung dreimal gewaschen. Nun wurden je 100  $\mu$ l Standards (siebenfache Verdünnungsreihe von 1:1 bis 1:64) und die Proben in die Wells gegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Standards sowie Proben wurden in zweifacher Ausführung aufgetragen und gemessen. Es folgten wieder fünf Waschschrte (wie oben beschrieben). Daraufhin wurden 100  $\mu$ l des verdünnten (1:50.000 mit Verdünnungslösung [postcoat-Lösung mit 0,05% Tween 20, 50mM TBS, pH 8,0 und 1% BSA]) HRP-Detection-Antikörpers in jedes Well übertragen und 60 min inkubiert, anschließend fünfmal mit Wasch-Lösung gewaschen. Danach erfolgte die Enzym-Substrat-Reaktion mit einer Inkubationszeit von 15 min im Dunkeln, wobei als Substrat pro Well 100  $\mu$ l TMB-Peroxidase-Lösung (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin [0,4g/l] in organischer Base und Peroxidase-Lösung B [0,02% in Citrat-Puffer]) dienten. Um diese Reaktion abzustoppen, wurden pro Well 100  $\mu$ l 2M  $H_2SO_4$  appliziert, anschließend die Platten mit einem Microtiter Plate Reader bei 450nm gelesen und mit Hilfe des Softmax<sup>®</sup>-Programms ausgewertet (77, 78). Die erhaltenen Daten wurden in mindestens zwei unabhängigen Experimenten verifiziert.

## 5 Apoptose – Nachweis

Zum Nachweis der Apoptose-Rate in den Colon-Epithelzellen wurden zwei verschiedene Techniken herangezogen.

### 5.1 Caspase-III-Aktivitäts-Messung

Caspasen sind Proteasen, die eine Kaskade an Reaktionen in einer apoptotischen Zelle auslösen. Letztendlich führt dies dann zum proteolytischen Abbau spezifischer zelleigener Proteine und somit zur Apoptose (79). Caspase III ist eine Effektorcaspase, die in diesem Experiment zur Bestimmung der Apoptose-Rate von Colon-Epithelzellen verwendet wurde, indem die Proben mit dem synthetischen Substrat N-Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-para-Nitroanilid (Ac-DEVD-pNA) versetzt wurden. Bei Anwesenheit von Caspase III entsteht das Chromophor para-Nitroanilid (pNA), welches bei einer Wellenlänge von 405nm absorbiert und dadurch in einem Absorptionsspektrometer gemessen werden kann (80).

Die Caspase-III-Aktivität wurde aus dem Zytosol von Colon-Epithelzellen bestimmt. Nachdem die bei -20°C gelagerten (siehe 4) Überstände auf Eis aufgetaut wurden, wurden die Proben mit einem handelsüblichen Caspase-Assay-Kit (Biomol Res. Lab., Plymouth, USA) kalorimetrisch auf die jeweilige Caspase-III-Aktivität hin getestet. Dem Assay-Puffer (50mM HEPES pH 7,4, 100mM NaCl, 0,1% CHAPS, 10mM DTT, 1mM EDTA, 10% Glycerin, Caspase III-Substrat Ac-DEVD-pNA) wurde entweder eine Probe (zytosoisches Protein), bovines Serumalbumin (BSA) als Negativkontrolle oder Caspase III-Enzym als Positivkontrolle in 96-Well -Platten zugegeben und zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Die Messung der Caspase-III-Aktivität erfolgte mittels eines ELISA-Plate-Readers, indem die optische Dichte (OD) bei 405nm bestimmt wurde. Die erhaltenen Daten wurden in mindestens zwei unabhängigen Experimenten verifiziert.

### 5.2 TUNEL-Assay

Eine weitere Möglichkeit Apoptose in Zellen nachzuweisen, ist der TUNEL-Assay. Dieser macht sich das Stadium der Apoptose zu Nutze, in dem die spezifische DNA-Fragmentierung durch endogene Nucleasen stattfindet. Diese schneiden zwischen den Nucleosomen, und es entstehen DNA-Fragmente mit einer Größe von ca. 200 Basenpaaren. Hierbei werden die freien 3-Hydroxy-DNA-Endstücke der Fragmente mit der terminalen Desoxynucleotidyl-Transferase (TdT) durch Addition von markierten Nucleotiden ermittelt (81).

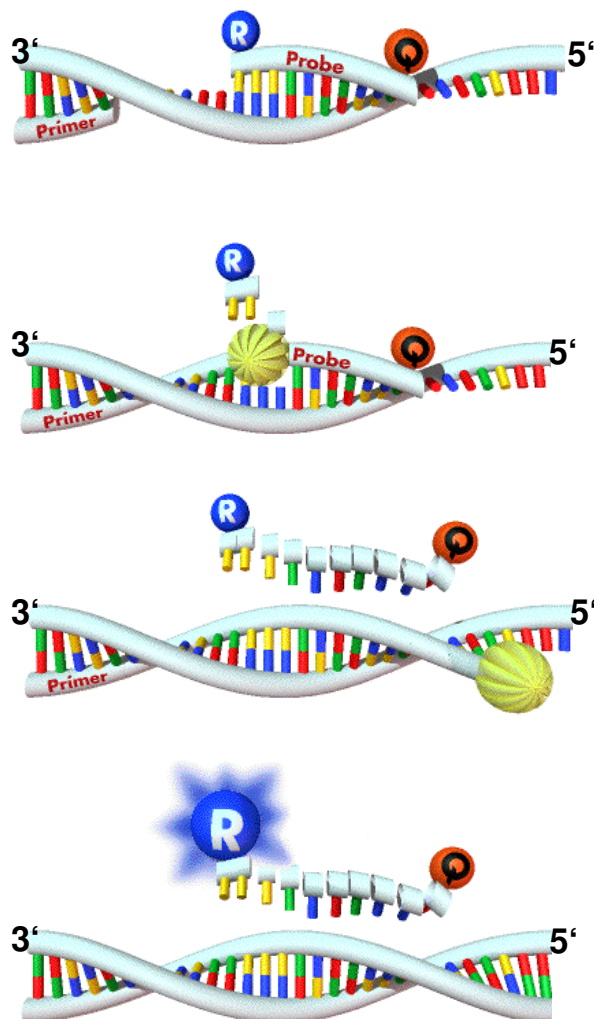
Nachdem die Tiere getötet, die Colons entnommen, mit PBS gewaschen, der Länge nach aufgeschnitten (1cm des distalen Drittels), auf Filterpapier getrocknet wurden, wurden die Gewebestücke über Nacht in 10% Formalin fixiert. Daraufhin wurde das

fixierte Gewebe in Paraffin eingebettet und der Länge nach 3µm dick geschnitten. Für die TUNEL-Färbung wurde ein handelsüblicher TUNEL-Assay -Kit (Merck, Darmstadt, Deutschland) verwendet. Zuerst wurde den Schnitten das Paraffin entzogen, daraufhin wurden sie rehydratisiert, indem sie bei Raumtemperatur der Reihe nach in Xylol, 100% Ethanol (EtOH), 90% EtOH, 80% EtOH, 70% EtOH und anschließend in 1xTBS (tris buffered saline) gewaschen wurden. Um die Schnitte nun zu permeabilisieren, wurden sie mit 100µl Proteinkinase K (20µg/ml) 20 min lang bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend erneut mit 1xTBS gewaschen. Zur Äquilibration des Gewebes wurde es mit 100µl 5xTdT-Äquilibrations-Puffer bedeckt und erneut 30 min lang bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss daran erfolgte die Labeling-Reaktion, wobei die Schnitte mit 60µl des TdT-Labeling-Reaktionsmixes (57µl Fluorescein-FragEL™ TdT Labeling Reaction Mix, 3µl TdT Enzym) in einer feuchten, dunklen Kammer eine Stunde lang inkubiert, danach zweimal je eine Minute mit 1xTBS gewaschen wurden. Die Schnitte wurden nun mit Fluorescein-FagEL™ Eindeckelmedium und einem Deckglass bedeckt. Positivkontrollen wurden generiert, indem sie mit DNase I (1µg/ml, gelöst in 1xTBS/ 1mM MgSO<sub>4</sub>; Roche, Mannheim, Deutschland) 20 min bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Negativkontrollen enthielten in dem TdT-Labeling-Reaktionsmix kein TdT-Enzym. Die Auswertung erfolgte mittels eines Fluoreszenz-Mikroskops (Fluorescein-Filter, 465nm-495nm), wobei in vier bis fünf Gesichtsfeldern die markierten apoptotischen Zellkerne der Colon-Epithelzellen ausgezählt wurden (82).

## **6 RNA-Isolation und quantitative real time polymerase chain reaction (qPCR) mittels TaqMan**

Die TaqMan-PCR ist eine Methode, mit deren Hilfe eine quantitative Genexpressions-Analyse erfolgen kann (Abb. 5). Um eine quantitative Analyse der Expression bestimmter Gene durchführen zu können, müssen diverse Voraussetzungen erfüllt sein: Man benötigt eine TaqMan-Sonde, die zwischen dem Revers- und Forward-Primer liegt und deren Schmelztemperatur um 10°C höher als die der Primer ist. Somit wird die Hybridisierung der Sonde vor der Hybridisierung der Primer mit dem gesuchten Gen sichergestellt, um keine Amplifikationsprodukte ohne Fluoreszenz zu erhalten. Die Sonde ist am 5'-Ende mit einem Reporter- (z. B. FAM = 6-Carboxyfluorescein, Anregungswellenlänge 488nm) und am 3'-Ende mit einem Quencher-Farbstoff (z. B. TAMRA = 6-Carboxy-Tetramethyl-Rhodamin;

Anregungswellenlänge 518nm) markiert. Die dabei verwendete Taq-Polymerase besitzt eine 5'-Exonuklease-Aktivität, wodurch der Reporter von der DNA abgelöst wird. Nach der vollständigen Synthese des PCR-Produkts wird auch der Quencher frei. Wird nun bei 488nm angeregt, zeigt der abgelöste Reporter ein Fluoreszenzsignal, wird hingegen die noch intakte Sonde angeregt, unterdrückt der Quencher das Signal des Reporters. Somit kann über die gemessene Fluoreszenz eine quantitative Aussage über Expression des gesuchten Gens gemacht werden (83).



1. Sequenzspezifische Anlagerung der Sonde (probe) und des for-Primer

2. Anlagerung der Taq-Polymerase (T), Primer-Verlängerung und Sondenhydrolyse, wobei der Reporter (R) freigesetzt wird.

3. Das PCR-Produkt wird vollständig synthetisiert, dabei werden Reporter (R) und Quencher (Q) getrennt.

4. In Abhängigkeit von freigesetztem Reporter (R) wächst das Signal und eine quantitative Aussage über die Expression des gesuchten Gens wird möglich.

**Abb. 5:** Prinzip der TaqMan-PCR; adaptiert nach Schild, Th. A. (83)

(T) Taq-Polymerase

(R) Reporter

(Q) Quencher

Nachdem die Tiere getötet wurden, wurden ca. 5mm des Colon-Gewebes entnommen, gereinigt, zur Stabilisierung des gewonnenen Gewebes in RNAlater (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) bei -20°C gelagert und im Anschluss daran die RNA mittels des RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) isoliert. Dazu wurden 20 bis 30mg Gewebe in RLT-Puffer (mit 1%  $\beta$ -Mercaptoethanol) gegeben. Um das Gewebe zu lysieren und zu homogenisieren, wurden die Ansätze in den QIAshredder (Qiagen, Hilden, Deutschland) überführt und 5 min bei Höchstgeschwindigkeit zentrifugiert. Zur von großen Gewebstücken gereinigten Lösung wurde genauso viel 70% EtOH wie der RLT-Puffer dazugegeben. Die Ansätze wurden nun in die RNeasy Mini Spin Säule, die einen RNA-Filter enthält, pipettiert und 1 min bei Höchstgeschwindigkeit zentrifugiert, wonach sich die RNA im Filter absetzte. Die Reinigung der RNA erfolgte durch Zugabe des RW1-Puffer in die RNeasy Mini Spin Säule und erneute Zentrifugation (84). Nun wurde die DNA mittels des RNase free DNase Sets (Qiagen, Hilden, Deutschland) verdaut, um die RNA aufzureinigen. Hierbei wurden die Proben mit einem Ansatz aus DNase I und RDD-Puffer (1:8) 30 min inkubiert und daraufhin 15 sec bei Höchstgeschwindigkeit zentrifugiert. Anschließend wurde erneut RW1-Puffer auf die Säule gegeben und nochmalig 1 min bei Höchstgeschwindigkeit zentrifugiert. Nun wurde RPE-Puffer (1 Vol RPE und 4 Vol 96-100% EtOH) auf die Säule pipettiert, 1 min bei Höchstgeschwindigkeit zentrifugiert, verworfen und der gleiche Schritt erneut durchgeführt. Daraufhin wurde die RNA aus dem Filter eluiert, indem die Säule auf ein 1,5ml-Tube gesetzt, 30-50 $\mu$ l RNase freies Wasser auf den Filter gegeben und 1 min bei Höchstgeschwindigkeit zentrifugiert wurde (85). Die sich im Tube befindende RNA wurde mittels Quant-iT<sup>TM</sup> RiboGreen® RNA Assay Kit (Molecular Probes Inc., Paisley PA4 9RF, UK) quantifiziert (86). Um eine TaqMan-PCR durchführen zu können, musste die RNA in cDNA umgeschrieben werden. Dies erfolgte über eine Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR) mit Hilfe des Reverse Transkription Systems (Promega GmbH, Mannheim, Deutschland) (87). Pro Probe wurde folgender Reaktionsmix angesetzt:

- 4 $\mu$ l MgCl<sub>2</sub> (25mM)
- 2 $\mu$ l 10x Puffer
- 2 $\mu$ l dNTP (10mM)
- 1 $\mu$ l Oligo(dt)<sub>15</sub>
- 0,5 $\mu$ l Recombinant RNasin® Ribonuclease Inhibitor

- 0,75µl Reverse Transkriptase (15U) → der Ansatz wurde mit RNA (optimale Menge 1000ng) und RNase freiem Wasser auf 20µl aufgefüllt.

Nun wurden die Proben im PCR-Cycler mit folgendem Programm in cDNA transkribiert:

- 42°C 15 min
- 99°C 5 min
- 4°C Pause.

Die Expression der antimikrobiellen Peptide murines Beta-Defensin 3 (mBD 3) und Cathelin-Related antimicrobial Peptide (CRAMP) wurde nach den vorbereitenden Schritten (siehe oben) mittels TaqMan®-qPCR (ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System; Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) als Single-Tube-Reaktion (20µl) auf 384-Well-Platten quantifiziert. Die TagMan® qPCR-Ansätze wurden, wie folgt, zusammengesetzt:

- 1µl cDNA (50ng/µl)
- 1µl forward Primer (18µM)
- 1µl reverse Primer (18µM)
- 1µl Sonde (5µM)
- 10µl TaqMan® - Mastermix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)
- 1µl GAPDH- (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase-) Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)

→ Der Ansatz wurde mit sterilem H<sub>2</sub>O auf 20µl aufgefüllt.

GAPDH diene als endogene Kontrolle, da es sich dabei um ein Houskeeping Gen handelt, das unabhängig expremiert wird. Als Primer wurden folgende Sequenzen verwendet:

- **mBD3**  
forward: TCGGTGC ATTGGCAACACT  
reverse: TGCAGCATTTGAGGAAAGGA



- **CRAMP**

forward: CAG CCCTTTCGGTTCAAGAA

reverse: CCCACCTTTGCGGA GAAGT

Die qPCR wurde nun mit folgendem Programm gestartet:

- 50°C 2 min
- 95°C 10 min → gefolgt von 40 Wiederholungen:
- 95°C 15 sec
- 60°C 1 min

Die mRNA-Expression der antimikrobiellen Peptide mBD3 und CRAMP wurde für jedes Tier dreifach gemessen. Die Quantifizierung der Fluoreszenz erfolgte mittels der Sequence-Detection-Software (SDS 2.1; Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) während des qPCR-Laufs.

## 7 Immunhistochemie

In den Gefrierschnitten wurde der Proliferationsmarker Ki67 immunhistochemisch nachgewiesen. Das Ki67-Protein (395kD) wird in proliferierenden Zellen während des Zellzykluses in der G1-, S- G2- und M-Phase exprimiert und ist somit in sich vermehrendem Gewebe nachweisbar. Da in ruhendem Gewebe, das sich in der G0-Phase befindet, kein Ki67-Protein auftritt, kann dieses Antigen als Marker für proliferativ tätige Zellen eingesetzt werden (88, 89).

Das den getöteten Tieren entnommene Colongewebe wurde mit PBS gespült, quer geschnitten, in Tissue Tek® O.C.T. Compound (Sakura Finetek Europe B.V.; Staufen, Deutschland) eingebettet, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und mittels eines Cryostats in 6µm dicke Schnitte geschnitten. Nach dem Auftauen der Schnitte wurden sie bei Raumtemperatur mit Aceton fixiert, dreimal 5 min in 1xPBS gewaschen, um die endogene Peroxidase zu blocken, mit 0,3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 min bei Raumtemperatur inkubiert, erneut mit 1xPBS gewaschen (drei Mal 10 min), und 30 min lang mit 5% Goat-Serum (mit 20% FCS in PBS; Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) in einer feuchten Kammer blockiert. Anschließend wurde Ki67 (150µg/ml in 1% Goat-Serum; DakoCytomation, Hamburg, Deutschland) als Primärantikörper auf die Schnitte gegeben und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen

(jeweils 5 min) mit PBS, wurde der biotinylierte Sekundärantikörper (1:500 in 5% Goat-Serum; Jackson ImmunoResearch, Suffolk, UK) auf die Schnitte appliziert und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgten wieder drei Waschschrte mit PBS (5 min). Um nun die positiven Zellen erkennen zu können, wurden der Vectastain ABC-Kit und anschließend der Vector NovaRed™ Substrate Kit (Vector Laboratories, Lörrach, Deutschland) verwendet. Dabei wurde zunächst mit einem Ansatz aus 1 Tropfen Avidin-Lösung (Lsg. A) und 1 Tropfen biotinyliertem Enzym (Lsg. B) in 5ml PBS für 45 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend dreimal 5 min mit PBS gewaschen. Daraufhin wurde die frisch angesetzte NovaRed™-Lösung auf die Schnitte getropft und die Farbentwicklung bis zur gewünschten Intensität unter dem Mikroskop beobachtet. Abgestoppt wurde die Reaktion mit H<sub>2</sub>O. Danach erfolgte die Kerngegenfärbung mit Hämatoxylin. Zum Schluss wurden die Objektträger wässrig eingedeckelt (90). Ausgewertet wurden je zwei Querschnitte pro Tier, indem positive Zellen gezählt und gemittelt wurden. Um die Spezifität zu verifizieren wurden, Isotyp-Kontrollen mitgeführt.

## **8 Bakterielle Translokation**

Um die obligat aeroben sowie die fakultativ anaeroben Mikroorganismen zu bestimmen, die sich in Stuhl, Colongewebe und mesenterialen Lymphknoten befinden, wurden pro Tier ein Stuhl-Pellet, 0,5cm Colongewebe und ein mesenterialer Lymphknoten separat in sterilem PBS aufbewahrt. Nachdem die Proben gewogen und homogenisiert wurden, wurden jeweils drei Proben, die entweder Stuhl, Colongewebe oder mesenteriale Lymphknoten enthielten, auf Blutagar-Platten ausplattiert und unter aerober Atmosphäre 24 Stunden lang bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Kolonien gezählt und die Anzahl der colony forming units (CFUs) pro Gramm Gewebe berechnet (91).

## **9 Statistische Auswertung**

Die Visualisierung der Daten erfolgte als Boxplots und wurde mittels PASW Statistics (Version 18.0; SPSS Inc., Chicago, IL, USA) erstellt. Die statistische Auswertung aller Daten erfolgte mit Hilfe des Statistik-Programms SPSS (Version 12.0; SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Die von den individuellen Tieren pro Gruppe erhaltenen Daten wurden auf Normalverteilung (Kolmogorov-Smirnov Test) getestet und anschließend mit dem parametrischen Student's T-Test analysiert.

Das Signifikanzniveau wurde auf  $p \leq 0,05$  festgelegt.

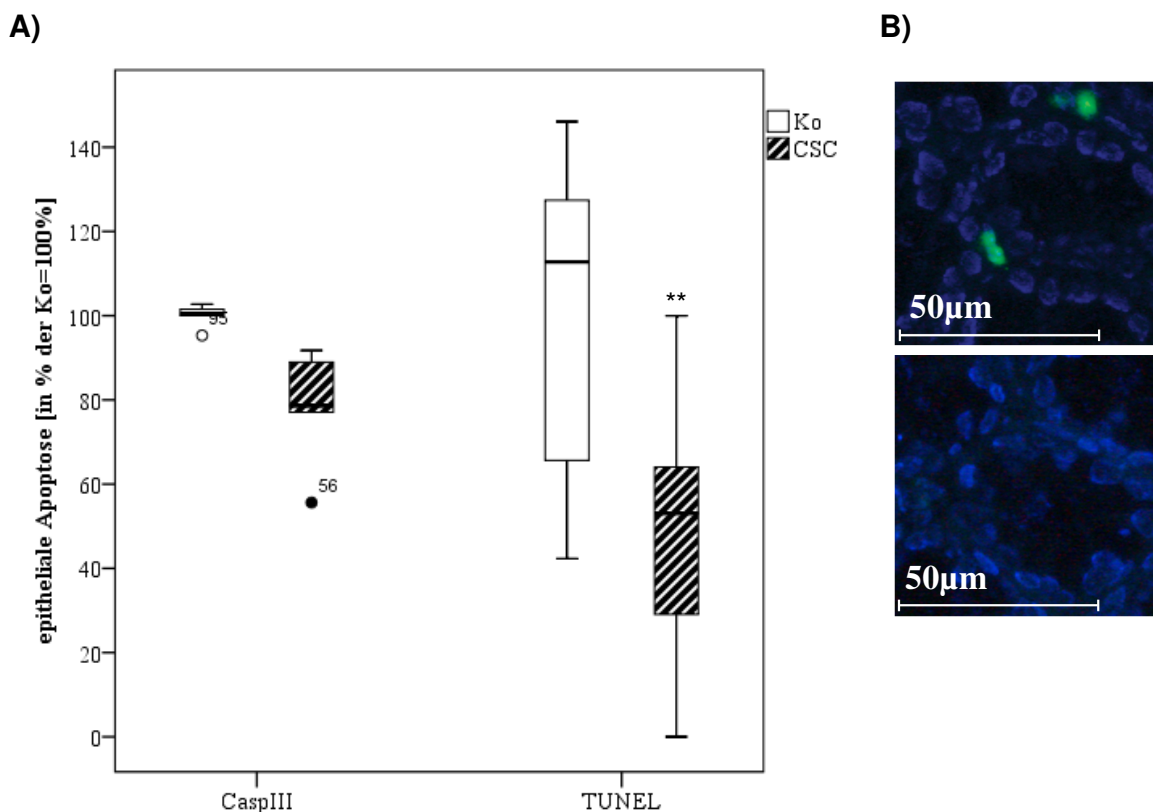
Die erhaltenen Daten, der in einer Gruppe (Ko vs. CSC) zusammengefassten Tiere wurden in mindestens zwei unabhängigen Experimenten validiert.

### III Ergebnisse

#### 1 Apoptose-Nachweis

Eine reduzierte Apoptose des Colon-Epithels wurde mit Hilfe zwei verschiedener Methoden (CaspIII-Aktivitäts-Messung, TUNEL-Assay) nachgewiesen. Dabei zeigte sich in der Caspase-III-Aktivitäts-Messung ein ca. 22%iger Rückgang der Apoptose (Abb. 6A; CaspIII). Die aus den Messungen erhaltenen Daten wurden in Prozent der Kontrollen angegeben; dabei wurden die Ergebnisse der Kontrollen als 100% festgesetzt. Die Daten wurden in drei unabhängigen Experimenten bestätigt.

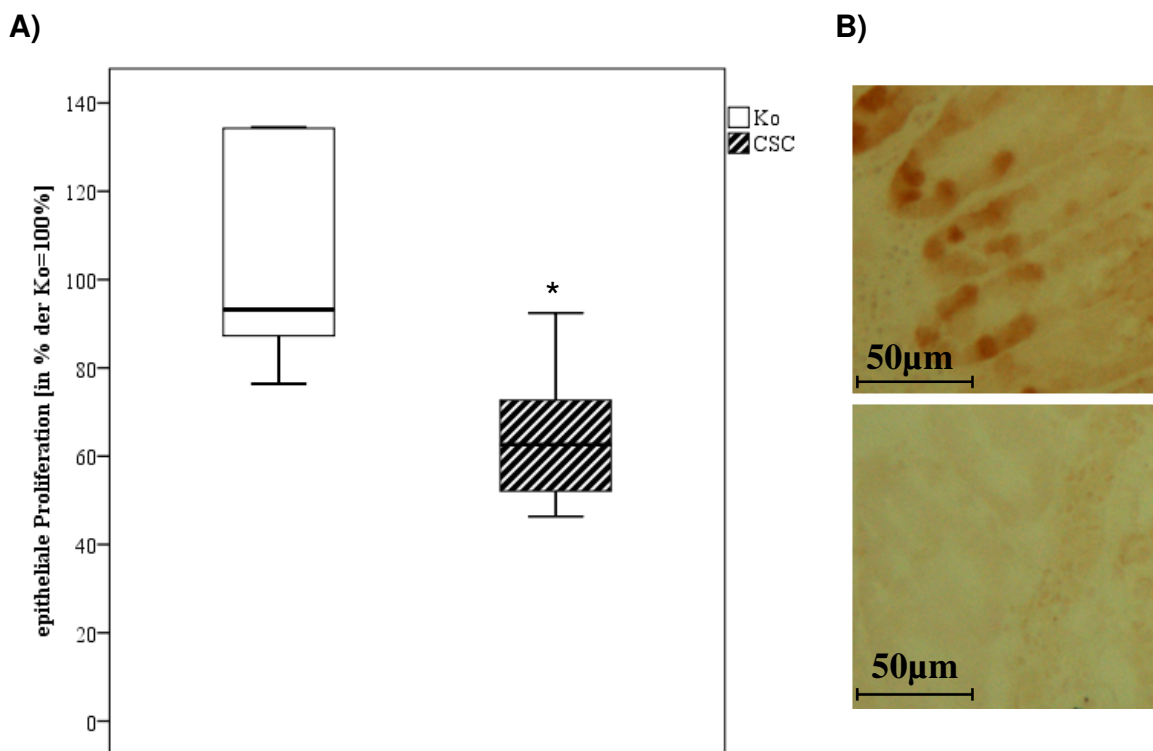
Der Apoptose-Nachweis mittels TUNEL-Assay zeigte eine signifikante Senkung ( $p < 0,001$ ) der Apoptose-Rate (Abb. 6A; TUNEL; Abb. 6B). Die Daten wurden als Boxplots dargestellt.



**Abb. 6:** Nachweis der Apoptose -Rate im Colon-Epithel mittels Caspase-III-Aktivitäts-Messung (A; links) und TUNEL-Färbung (A; rechts/ B: Ko oben; CSC unten; die Markierung entspricht reell 50µm). Sowohl die CSC- als auch die Kontrollgruppe zeigt einen Pool aus 4 bis 6 Tieren im CaspIII-Graphen. Der Graph des TUNEL-Assays repräsentiert pro Gruppe 8 bis 30 Tiere. Die Daten sind als Boxplots dargestellt. Das Ergebnis wurde in drei unabhängigen Experimenten validiert. \*\*  $p < 0,001$  (Statistik: Student's T-Test).

## 2 Epitheliale Zell-Proliferation mittels Ki67-IHC

Die statistische Auswertung ergab einen signifikanten Rückgang der Proliferation des Colon-Epithels nach zehnstündiger CSC-Exposition (Abb. 7A;  $p \leq 0,05$ ). Abb. 7B zeigt die quantifizierten Unterschiede der immunhistochemischen Färbung mit dem Proliferations-Marker Ki67, wobei das obere Bild Colon-Gewebe der Kontrollen, das untere der CSC-exponierten Mäuse zeigt (Abb. 7B). Die aus den Messungen erhaltenen Daten wurden in Prozent der Kontrollen angegeben; dabei wurden die Ergebnisse der Kontrollen als 100% festgesetzt. Die Darstellung der Daten erfolgte als Boxplots.



**Abb. 7:** Quantifizierung der Proliferation im Colon-Gewebe mittels Ki67-IHC.

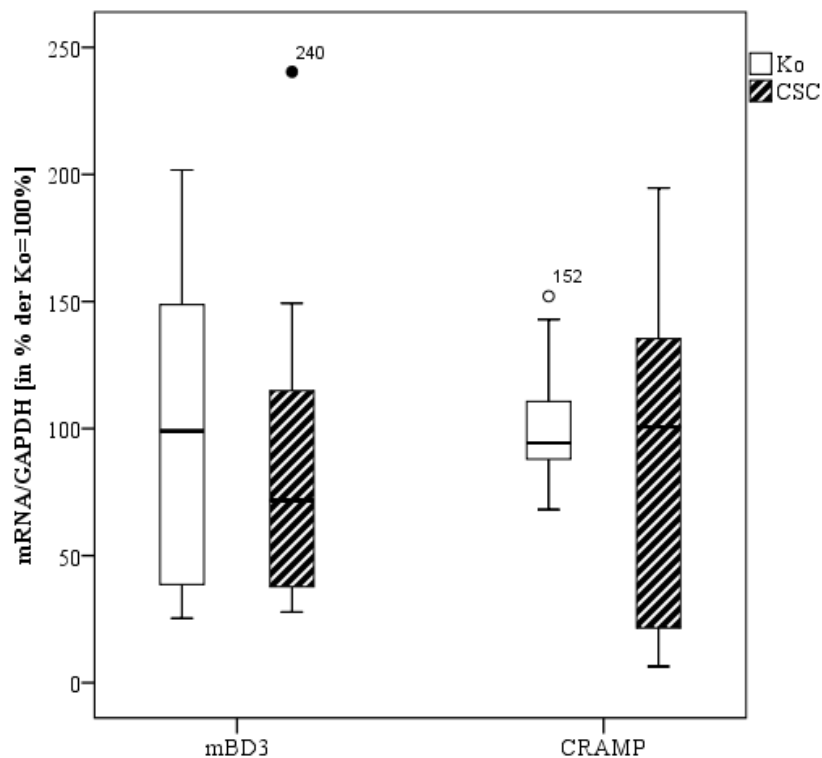
Abb. 7A: Die Daten sind als Boxplots dargestellt; dabei entspricht 100% den Kontrollen.

\*  $p \leq 0,05$  (Statistik: Student's T-Test). Der Graph repräsentiert pro Gruppe (CSC vs. Ko) 8 bis 30 Tiere.

Abb. 7B: IHC-gefärbtes Colon-Epithel (oben: Ko; unten: CSC), die Markierung entspricht reell 50µm.

### 3 Expression der antimikrobiellen Peptide mBD3 und CRAMP

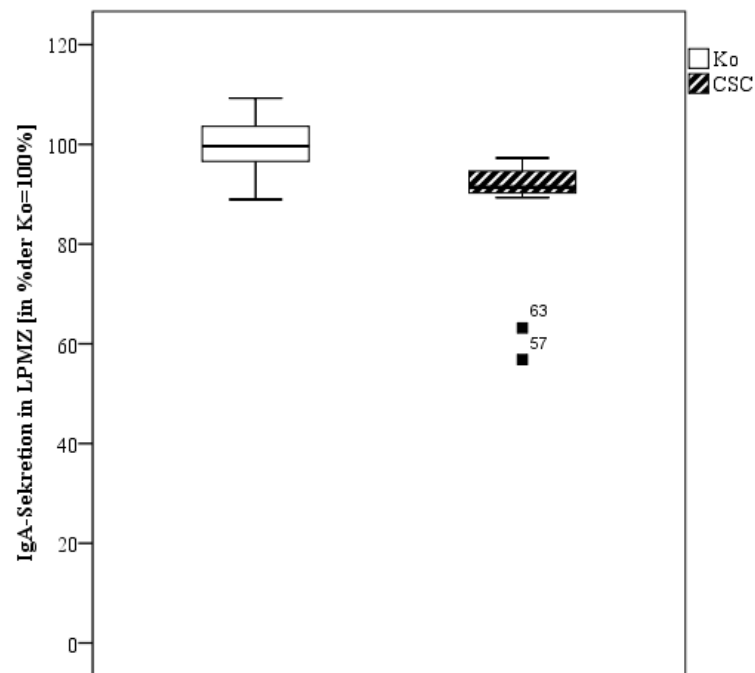
Die statistische Auswertung der Expression der antimikrobiellen Peptide mBD3 und CRAMP zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontroll- und CSC-Gruppe (Abb. 8). Die aus den Messungen erhaltenen Daten wurden in Prozent der Kontrollen angegeben; dabei wurden die Ergebnisse der Kontrollen als 100% festgesetzt. Die Daten wurden als Boxplots dargestellt.



**Abb. 8:** Messung der mBD3- und CRAMP-Expression in Colon-Gewebe mittels TaqMan-PCR. Die Graphen repräsentieren pro Gruppe (CSC vs. Ko) 8 bis 30 Tiere. Die Daten sind umgerechnet in Prozent der Kontrollen als Boxplots dargestellt; dabei entspricht 100% den Kontrollen. (Statistik: Student's T-Test).

#### 4 IgA-Sekretion der Lamina propria mononukleären Zellen

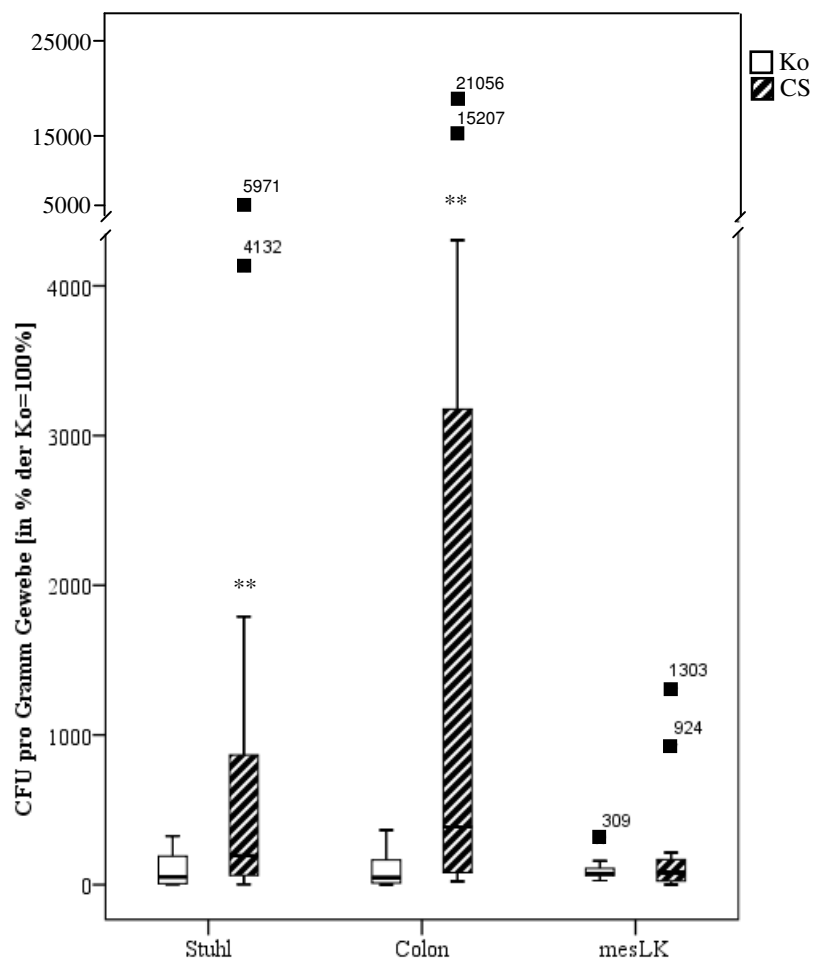
Die Sekretion des IgA aus LPMZ zeigte nach zehnstündiger CSC-Exposition eine Reduktion um ca. 10% (Abb. 9). Die aus der Messung erhaltenen Konzentrationen wurden in Prozent der Kontrollen angegeben; dabei wurden die Ergebnisse der Kontrollen als 100% festgesetzt. Die Daten wurden in zwei unabhängigen Experimenten bestätigt. Die Darstellung der Daten erfolgte als Boxplots.



**Abb. 9:** Messung der IgA – Sekretion in vitro in isolierten/ nicht-stimulierten (PBS; 24h) LPMZ mittels ELISA. Die Daten sind umgerechnet in Prozent der Kontrollen, als Boxplots dargestellt; dabei entspricht 100% den Kontrollen Sowohl die CSC- als auch die Kontrollgruppe zeigt einen Pool aus 4 bis 6 Tieren. Das Ergebnis wurde in zwei unabhängigen Experimenten validiert. (Statistik: Student's T-Test).

## 5 Bakterielle Translokation

Ich konnte sowohl in Stuhl als auch in Colon-Gewebe der CSC-exponierten Tiere eine signifikant erhöhte Anzahl an CFUs im Vergleich zu den Kontrolltieren nachweisen (Abb. 10 links, Mitte;  $p < 0,001$ ). Die mesenterialen Lymphknoten der CSC-exponierten Mäuse zeigten keinen signifikanten Anstieg der CFUs im Vergleich zu Kontrolltieren (Abb. 10, rechts). Die aus den Messungen erhaltenen Daten wurden in Prozent der Kontrollen angegeben; dabei wurden die Ergebnisse der Kontrollen als 100% festgesetzt. Die Darstellung der Daten erfolgte als Boxplots.



**Abb. 10:** Bakterielle Translokation in Stuhl, Colon-Gewebe und mesenterialen Lymphknoten. Die Daten sind als Boxplots, umgerechnet in Prozent der Kontrollen, dargestellt; dabei entspricht 100% den Kontrollen. Die Graphen repräsentieren pro Gruppe (Ko vs. CSC) 13 bis 16 Tiere. \*\*  $p < 0,001$  (Statistik: Student's T-Test.)



## IV Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden die Auswirkungen eines zehnstündigen psychosozialen Stressors auf die intestinale Barrierefunktion des Colons untersucht. Es ist bekannt, dass chronisch psychosozialer Stress vielfältige psychologische (8, 92, 93), physiologische (7, 27, 94) sowie immunologische (31, 50) Veränderungen bei Mensch und Tier verursacht. Im Tiermodell Maus erwies sich dabei eine CSC-Exposition als geeignetes Stressparadigma, um eine derartige Stresssituation im Labor zu erzeugen (7), da dieses Modell relativ gut mit der natürlichen Situation von Mäusen vergleichbar ist: Mäuse leben in sozialen Gruppen zusammen, wobei es dabei, ähnlich wie im CSC-Modell (II, 2), zu Auseinandersetzungen um die individuelle Position innerhalb der Hierarchie kommt.

Aus der von Reber et al. 2007 (7) veröffentlichten Studie ist bekannt, dass eine 19tägige CSC-Exposition eine spontane Colitis in Mäusen auslöst. Diese zeigt sich unter anderem in histologischen Schäden der Colon-Mukosa sowie erhöhter Zytokin-Sekretion (IFN $\gamma$ , TNF, IL-10). Darüber hinaus wurde eine initiale Hochregulierung der HPA-Achse und des vegetativen Nervensystems während der Stress-Dauer festgestellt, die im Zusammenhang mit der Colitis-Entstehung steht, da die CSC-induzierte Colitis durch eine der Stresssituation vorausgehende Adrenektomie verhindert werden konnte (7). Hierbei zeigte sich nach 24h CSC-Exposition die Aktivierung der HPA-Achse in einem erhöhten Plasma-CORT-Spiegel, sowie die des sympathischen Nervensystems in einer vermehrten Tyrosinhydroxylase-Expression (Schlüsselenzym im anabolen Katecholamin-Stoffwechsel) im Colon, wobei sich sowohl die CORT-Konzentration als auch die Tyrosinhydroxylase-Expression bereits nach 48h wieder dem ursprünglichen Niveau näherten. Die makroskopisch sichtbare Gewebsschädigung zeigte sich allerdings erst nach dem 14. Tag der Stress-Exposition. Dies deutet darauf hin, dass die Stress-Antwort-Systeme bei chronischem Stress nicht mehr fähig sind, adäquat zu reagieren, was letztendlich zu einer erhöhten Anfälligkeit für entzündungsauslösende Prozesse führt. Weiterhin konnten Reber et al. (unveröffentlichte Daten) zeigen, dass der Anstieg der CORT-Konzentration im Plasma bereits nach zehnstündiger CSC-Exposition auftrat, weswegen in der vorliegenden Studie diese Dauer der Stressexposition gewählt wurde.

Akuter Stress und erhöhte Plasma-CORT-Konzentration konnten auch von Meddings et al. mit einer erhöhten Permeabilität des Gastrointestinaltrakts in Verbindung gebracht werden. Sie unterzogen männliche Wistar Ratten einer moderaten (3h Restraint-Stress) bzw. einer intensiveren Stress-Prozedur (20 min Forced-Swim-Test),

maßen in den darauf folgenden 24h die Permeabilität des Gastrointestinaltrakts sowie den Plasma-CORT-Spiegel. Dabei zeigte sich, dass eine durch die Stressexposition erhöhte Plasma-CORT-Konzentration die erhöhte gastrointestinale Permeabilität verursacht, da bei Tieren, die vor der Stress-Prozedur einer Adrenektomie unterzogen wurden, keine Veränderungen der Permeabilität festgestellt werden konnten (95). Auch weitere tierexperimentelle Studien geben Anhaltspunkte dafür, dass Entzündungen besonders in Arealen mit einer Dysfunktion der intestinalen Barriere entstehen (96, 97).

Um nun diese bisher unbekannten Pathomechanismen, die die intestinale Barrierefunktion beeinträchtigen und vermutlich zu Entstehung chronisch entzündlicher Darmerkrankungen beitragen, zu erklären, wurden männliche C57BL/6-Mäuse einer zehnstündigen CSC-Prozedur (siehe II, 2+3) ausgesetzt. Im Anschluss daran untersuchten wir in der vorliegenden Arbeit die Funktionalität der epithelialen Barrierefunktion anhand verschiedener Parameter, wie die IgA-Sekretion aus Lamina propria mononukleären Zellen, die Expression der antimikrobiellen Peptide mBD3 und CRAMP, die epitheliale Proliferations- sowie Apoptose-Rate und die Translokation von Mikroorganismen von Stuhl in das Colon-Gewebe sowie in mesenteriale Lymphknoten. Dabei zeigte sich in den gestressten Tieren eine verminderte IgA-Sekretion aus Lamina propria mononukleären Zellen, jedoch kein Effekt der mBD3- und CRAMP-mRNA-Expression. Des Weiteren fand sich zum einen eine deutlich gesenkte Apoptose-Rate sowie Proliferation des Epithels. Diese Veränderungen könnten eine im Vergleich zu einzeln gehaltenen Kontrolltieren herabgesetzte intestinale Barrierefunktion zumindest zum Teil erklären. Tatsächlich zeigte sich eine erhöhte Translokation von luminalen Bakterien aus dem Stuhl in das Colon-Gewebe. Die auch im Stuhl gefundene erhöhte Anzahl an Mikroorganismen ist überraschend. Möglicherweise spielt hier die beobachtete reduzierte IgA-Sekretion eine Rolle, da dadurch weniger Mikroorganismen gebunden und unschädlich gemacht werden und somit im Stuhl vermehrt proliferieren können.

## **1 Intestinale Barrierefunktion**

### **Epitheliale Apoptose- und Proliferations-Rate**

Ein bereits in der Einleitung beschriebener Mechanismus, der sich für die Barrierefunktion des intestinalen Epithels verantwortlich zeigt, ist die Lebensdauer und Proliferation der Colon-Epithelzellen. Undifferenzierte Stammzellen befinden sich am

Kryptengrund, teilen sich dort regelmäßig und wandern an der Krypte entlang in Richtung Darmlumen, während sie sich zu Enterozyten bzw. Becherzellen differenzieren. Nach drei bis fünf Tagen erfolgt der programmierte Zelltod, die Apoptose. Dieses Gleichgewicht zwischen Apoptose und Zellregeneration hält die Barrierefunktion des Gastrointestinaltrakts aufrecht. Ist das Gleichgewicht jedoch durch entzündliche Prozesse einhergehend mit apoptotischen Veränderungen gestört, büßt die intestinale Barriere an Funktion ein (48, 98).

In der vorliegenden Arbeit konnte mittels verschiedener Methoden übereinstimmend gezeigt werden, dass nach zehnstündiger Stress-Exposition zum einen die Apoptose, zum anderen aber auch die Proliferation der Epithelzellen der Mukosa deutlich herabgesetzt ist (III, 2 + 4, Abb. 6 und 7). Dies bedeutet, dass die Zellen, die diese funktionale Barriere bilden, somit wesentlich später absterben und in das Darmlumen abgeschilfert werden, wodurch sie vermutlich aber an Funktionsfähigkeit einbüßen (99). Im Gegensatz zu dem in dieser Arbeit gefundenen Ergebnis wiesen Boudry et al. 2007 einen Zusammenhang zwischen chronischer Stress-Exposition (Water-Avoidance-Stress; 1h täglich an fünf bzw. zehn aufeinander folgenden Tagen) und erhöhter Permeabilität (gemessen anhand des HRP-Flux) sowohl nach fünf als auch nach zehntägiger Stress-Prozedur des Duodenums sowie des Ileums bei Brown Norway background Ratten nach, wobei eine erhöhte Apoptose-Rate der epithelialen Zellen nur nach fünftägigem WAS auftrat (49). Verschiedene Studien zeigen auch, dass die Permeabilität und somit die Barrierefunktion der Colonepithelzellen vor allem durch die tight junctions, Proteinkomplexe, die die parazelluläre Permeabilität eines Epithels regulieren, gebildet wird (100, 101). So konnten Mazzon et al. am Tiermodell Maus (männliche C57BL/6 Mäuse) Stress, induzierte Colitis und die Funktion von tight junctions im Ileum in Zusammenhang bringen. Dabei fanden sie heraus, dass sowohl Struktur als auch Funktion der tight junctions durch eine vorausgehende zweistündige Restraint-Stressprozedur, ebenso wie bei einer DSS-induzierten Colitis, deutlich beeinträchtigt ist (46, 47).

Zusätzlich konnte in der vorliegenden Studie eine herabgesetzte Proliferation der Epithelzellen gezeigt werden, was wiederum bedeutet, dass weniger neue funktionstüchtige Zellen nachproduziert werden. Eine ähnliche Beobachtung machten Greant et al. schon 1988, wobei sie das Colon männlicher Wistar-Ratten nach zwei- bzw. zwölfstündigem cold Restraint-Stress untersuchten. Hierbei konnten sie nach der zwölfstündigen, nicht aber nach zweistündiger Stress-Exposition, eine verringerte Epithelzell-Proliferation nachweisen (102). Im Gegensatz sowohl zu unseren

Ergebnissen als auch zu der Studie Greants finden sich zahlreiche Studien, die eine erhöhte Proliferation der intestinalen Epithelzellen in Zusammenhang mit Colitis postulieren (49, 103). So zeigten Vetuschi et al. an männlichen Sprague Dawley Ratten, dass die Proliferation von Colon-Epithelzellen signifikant erhöht war, nachdem eine spontane DSS-induzierte Colitis ausgelöst wurde (103). Da dieses Modell jedoch auf einer primären Schädigung von Epithelzellen beruht, ist es auch nachvollziehbar, dass eine reaktive Hyperproliferation einsetzt.

### **Antimikrobielle Peptide mBD3 und CRAMP**

MBD3 und CRAMP gehören in die Familie der antimikrobiellen Peptide. Wie in der Einleitung bereits ausführlich dargestellt, unterteilt man diese endogenen Antibiotika in Defensine, wozu mBD3 zählt, und Cathelicidine, wozu CRAMP gehört. Diese endogenen Antibiotika besitzen ein breites Spektrum an antimikrobiellen Eigenschaften sowohl gegen Gram-negative als auch gegen Gram-positive Bakterien und bilden somit eine Barriere, die potenziell schädliche Pathogene am Eindringen in die Mukosa hindert (54-57, 63).

Obwohl es zahlreiche Studien gibt, in denen eine Induzierung antimikrobieller Peptide in Zusammenhang mit Colitis beobachtet werden konnte (104-107), ergab sich in der vorliegenden Arbeit keine signifikante Änderung der mBD3-, sowie CRAMP-Expression (III, 3, Abb. 8).

Einen Zusammenhang zwischen zum einen subjektiv empfundener psychischer Belastung mit zusätzlich physiologisch ausgelöstem Stress (Cold Water Pressor-Test; dabei wird die nicht-dominante Hand über einen Zeitraum von 15 min, 30 min oder 60 min in 45 sec-Intervallen in 4°C kaltes Wasser getaucht, danach erfolgt eine 15 sec lange Pause, um Gewöhnungseffekte zu vermeiden), erhöhter Defensin-Expression im intestinalen Epithel und einer erhöhten intestinalen Permeabilität wiesen Alonso et al. in einer Studie mit gesunden, fertilen Frauen nach. Dabei konnten sie zeigen, dass Frauen, die vorausgehend subjektiv empfundenen psychischen Belastungen ausgesetzt waren, eine Aktivierung der Stress-Antwort-Systeme (HPA-Achse, Sympathikus) zeigten, sowie einen Anstieg der  $\alpha$ -Defensine, einhergehend mit erhöhter Permeabilität im Gastrointestinaltrakt (108).

Im Hinblick auf die bisher veröffentlichten Studien wäre eine mögliche Erklärung unserer Ergebnisse, die keine Induzierung der Defensin- und Cathelicidin-Expression aufzeigen, eine zu kurze Dauer der Stress-Exposition, um die Expression dieser Gene zu induzieren.

### **IgA-Sekretion der Colon-Mukosa**

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, gibt es inzwischen zahlreiche Studien, die die entscheidende Bedeutung des Gastrointestinal-Trakts als Immunorgan bestätigen (4, 50). Alle schleimproduzierenden Oberflächen im Körper sezernieren Antikörper der Klasse IgA. Diese dimeren Immunglobuline werden von mukosaständigen Plasmazellen der Lamina propria produziert und über Transzytose ins Darmlumen freigesetzt. Dort schützen sie die Mukosa vor eindringenden potenziell schädlichen Erregern, wie Viren, Bakterien oder parasitären Mikroorganismen (39). Bekannt ist auch, dass daher bei Menschen, die an einem selektiven IgA-Mangel leiden, häufiger im Vergleich zu Gesunden, unter anderem Infektionen der Atemwege, des Gastrointestinaltrakts, entzündliche Darmerkrankungen sowie maligne Proliferationen auftreten (109).

In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass bei Tieren nach zehnstündiger CSC-Exposition die IgA-Sekretion deutlich herabgesetzt ist (III, 1, Abb. 9), was, wie oben beschrieben, den Schutzmechanismus des Darmepithels verringert, und somit die Barriere für Pathogene leichter zu durchdringen ist. Diese reduzierte Sekretion nach zehnstündiger Stress-Exposition ist möglicherweise eine Folge des durch den bei Stress anfänglich aufgrund der aktivierten HPA-Achse erhöhten CORT-Spiegels (7). Jarillo-Luna et al. (2006) konnten an männlichen BALB/c Mäusen ebenfalls eine Reduktion des sekretorischen intestinalen IgAs mit einer gleichzeitig erhöhten Plasma-CORT- sowie -Noradrenalin-Konzentration nach Restraint-Stress-Prozedur (1h bzw 4h an vier aufeinanderfolgenden Tagen) zeigen, wobei jedoch die Anzahl der IgA produzierenden Zellen unverändert blieb. Im Gegensatz dazu fand man bei Tieren, die einer dem Stress vorausgehenden Adrenektomie unterzogen wurden, erhöhte IgA-Spiegel. Dies deutet auf die Einflussnahme von CORT auf die IgA-Produktion hin (110). Ähnliche Resultate an männlichen Wistar Ratten fanden Reyna-Garfias et al. 2010. Sie konnten zeigen, dass restraint-Stress (3h an sieben aufeinander folgenden Tagen) sowohl die IgA-Konzentration als auch die mRNA-Expression der  $\alpha$ -Kette des IgA in Ileum und Duodenum erhöht. Des Weiteren wiesen sie nach, dass sowohl eine Adrenektomie als auch eine chemische Inaktivierung des Sympathikus den Effekt auf die erhöhte IgA-Sekretion beseitigt. Jedoch stieg der IgA-Spiegel in adrenektomierten Tieren nach sowohl GC- als auch NAd-Gabe. Somit weisen auch diese Ergebnisse darauf hin, dass sowohl GCe als auch der aktivierte Sympathikus zwischen Stress und erhöhter IgA-Sekretion vermitteln (111).

### **Bakterielle Translokation**

Stress wurde schon in einigen Studien mit einer bakteriellen Translokation endogener Bakterien aus dem Gastrointestinaltrakt in mesenteriale Lymphknoten, Leber, Milz und andere Organe in Verbindung gebracht (112-115). Ein Beispiel hierfür ist die Arbeit von Anderlik et al., die bereits 1990 eine spontane Translokation Gram-positiver Keime in Mäusen nach Kälteexposition untersuchten und nachwiesen (112). Auch Velin et al. konnten anhand ultrastruktureller Untersuchungen eine erhöhte Aufnahme von Bakterien im Darmepithel von stressexponierten Wistar-Ratten vorweisen. Dabei wurde als akuter Stressor ein einmaliger einstündiger Water-Avoidance-Stress, als chronischer Stressor einstündiger WAS an zehn aufeinander folgenden Tagen eingesetzt. Zum einen stellten sie fest, dass sowohl akuter als auch chronischer Stress die intestinale Permeabilität (gemessen mittels HRP-Flux), zum anderen, dass er die bakterielle Translokation in das Darmepithel erhöht (115).

In der vorliegenden Arbeit konnte zum einen gezeigt werden, dass stressexponierte Mäuse eine signifikant höhere Anzahl an CFUs im Stuhl (III, 5, Abb. 10 links) aufwiesen. Durch die zehnstündige CSC-Exposition kommt es zu einer Aktivierung der HPA-Achse (Reber et al., unveröffentlichte Daten), die letztendlich über eine CORT-Ausschüttung immunsuppressive Wirkung auf den Organismus ausübt, die sich u. a. auch in einer erniedrigten IgA-Sekretion (III, 1, Abb. 9) zeigt, was eine verstärkte Proliferation der Mikroorganismen im Stuhl zur Folge hat. Zum anderen zeigte sich in der vorliegenden Studie ein zu den Ko-Tieren signifikant erhöhter Befall des Colon-Gewebes (III, 5, Abb. 10, Mitte), jedoch nicht der mesenterialen Lymphknoten (III, 5, Abb. 10, rechts). Dieses Ergebnis spiegelt die eingeschränkte intestinale Barrierefunktion wider, die in dieser Arbeit anhand verschiedenster Parameter nachgewiesen werden konnte. Dass die mesenterialen Lymphknoten keinen erhöhten bakteriellen Befall zeigten, kann an der Dauer der Stress-Exposition bzw. der im Anschluss daran sofortigen Tötung der Tiere liegen, da es zahlreiche Studien gibt, die einen Befall peripherer lymphoider Organe nach chronischem Stress nachweisen konnten (114, 116, 117). Zum Beispiel fanden Bailey et al. eine Translokation Gram-positiver Kokken nach sechstägigem social-disruption-Stress (2h) in Leisten-Lymphknoten männlicher C57BL/6 Mäuse (117). Einen interessanten Zusammenhang zwischen psychischem Stress in Form von mehrtägigem Schlafentzug und bakterieller Translokation entdeckten Everson et al. (114) in männlichen Ratten, wobei sich die Keime in mesenterialen Lymphknoten, Leber, Milz und Lunge ausbreiteten.

## 2 Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Pathomechanismen untersucht, die vermutlich einen Zusammenhang zwischen chronisch psychosozialen Stress und der Ätiologie chronisch entzündlicher Darmerkrankungen erklären könnten. Dazu wurde das von Reber et al. (7) etablierte CSC-Modell als Stressor eingesetzt, um einen möglichst natürlichen psychosozialen Stress zu erzeugen, der zusätzlich aufgrund dieser chronisch psychosozialen Komponente eine Vergleichbarkeit mit Humanstudien erleichtert. Außerdem ist bekannt, dass dieses Stress-Modell Colitis-ähnliche Symptome bei männlichen C57BL/6 Mäusen auslöst. Da zahlreiche Untersuchungen vermuten lassen, dass psychischer Stress in Zusammenhang mit der Entwicklung bzw. dem Krankheitsverlauf einer CED steht (4, 5, 10), bestand das Ziel dieser Arbeit darin, auf molekularer und histologischer Ebene die Mechanismen aufzudecken, die eventuell zur Entstehung einer Stressinduzierten intestinalen Entzündung beitragen. Schwerpunkt der Untersuchungen lag dabei auf den Stressinduzierten Effekten auf die intestinale Barriere. Hierfür wurden das Colon-Gewebe sowie mesenteriale Lymphknoten männlicher C57BL/6 Mäuse nach zehnstündiger CSC-Exposition auf unterschiedliche immunologische sowie histologische Parameter hin untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass die intestinale Barrierefunktion, die eine wichtige immunologische Abwehrfunktion für den Körper darstellt, aufgrund der Stress-Reaktion geschwächt ist. Dies zeigte sich in einer reduzierten IgA-Sekretion der Lamina propria mononukleären Zellen, einer verminderten Apoptose- sowie Proliferations-Rate des Colon-Epithels und einer daraus resultierenden Translokation bakterieller Keime in das Colon-Gewebe, wobei die Epithel-Schädigung noch nicht in dem Maße fortgeschritten war, dass mesenteriale Lymphknoten eine nachweisbare bakterielle Dislokation aufwiesen. Ein weiterer Parameter, der in Zusammenhang mit der Immunfunktion und somit mit der Entstehung von CED steht, sind die antimikrobiellen Peptide mBD3 und CRAMP. Dass sich hierbei keine veränderte Expression zeigte, lag vermutlich an der zu kurzen Dauer der Stressexposition und der im Anschluss daran sofortigen Tötung der Tiere, so dass diese Mechanismen auf DNA-Ebene noch nicht in Gang gesetzt wurden. Im Hinblick darauf wäre es sinnvoll, diese Untersuchungen zusätzlich nach länger dauernder Stress-Exposition zu wiederholen. Ein weiterer Ansatzpunkt der Untersuchungen der antimikrobiellen Peptide wäre deren Funktion. Da Analysen der Expression keine Aussage über die antibiotische Wirkung des untersuchten Defensins sowie Cathelicidins machen, wäre eine weitere sinnvolle Möglichkeit, die Effektivität

von aus Colongewebe isoliertem mBD3 und CRAMP zu testen. Dies könnte in vitro mit dem von Nuding et al. (118) beschriebenen Assay erfolgen. Hierbei werden unterschiedliche Bakterienstämme mit dem isolierten antimikrobiellen Peptid inkubiert. Der antibiotische Effekt, d. h. die Membranschädigung dadurch (siehe 2.2.2), wird anhand des veränderten Membranpotenzials mittels Durchflusszytometrie mit vorausgehender Membranpotenzialabhängiger Färbung detektiert und mit Kontrollen verglichen.

Zusammenfassend zeigt sich dieses Stressmodell gut geeignet für Untersuchungen, die in Zusammenhang mit psychosozialem Stress stehen, da es zum einen die natürliche Lebenssituation von Nagern imitiert und zum anderen den Vergleich mit psychosozialen Stresssituationen beim Menschen erleichtert. Daher bietet es sehr gute Möglichkeiten, Erkrankungen, deren Entstehung durch psychischen Stress begünstigt wird, auf molekularer, histologischer, aber auch makroskopischer Ebene genauer zu untersuchen sowie pharmakologische Eingriffsmöglichkeiten auf den verschiedensten Ebenen zu finden. Dies erscheint mir ein wichtiges Forschungsziel, da in der heutigen schnelllebigen Zeit psychosoziale Stressoren zum Alltag gehören und eine steigende Inzidenz der dadurch verursachten Erkrankungen sowie deren einschränkende Auswirkungen auf die Lebensqualität immer häufiger auftreten.



## Literaturverzeichnis

1. **Selye H** 1998 A syndrome produced by diverse nocuous agents. 1936. J Neuropsychiatry Clin Neurosci 10:230-231
2. **McEwen BS** 1998 Protective and damaging effects of stress mediators. N Engl J Med 338:171-179
3. **Vicario M, Guilarte M, Alonso C, Yang P, Martinez C, Ramos L, Lobo B, Gonzalez A, Guila M, Pigrau M, Saperas E, Azpiroz F, Santos J** Chronological assessment of mast cell-mediated gut dysfunction and mucosal inflammation in a rat model of chronic psychosocial stress. Brain Behav Immun 24:1166-1175
4. **Mawdsley JE, Rampton DS** 2005 Psychological stress in IBD: new insights into pathogenic and therapeutic implications. Gut 54:1481-1491
5. **Okabe N** 2001 The pathogenesis of Crohn's disease. Digestion 63 Suppl 1:52-59
6. **Persoons P, Vermeire S, Demyttenaere K, Fischler B, Vandenberghe J, Van Oudenhove L, Pierik M, Hlavaty T, Van Assche G, Noman M, Rutgeerts P** 2005 The impact of major depressive disorder on the short- and long-term outcome of Crohn's disease treatment with infliximab. Aliment Pharmacol Ther 22:101-110
7. **Reber SO, Birkeneder L, Veenema AH, Obermeier F, Falk W, Straub RH, Neumann ID** 2007 Adrenal insufficiency and colonic inflammation after a novel chronic psycho-social stress paradigm in mice: implications and mechanisms. Endocrinology 148:670-682
8. **Sapolsky RM** 2005 The influence of social hierarchy on primate health. Science 308:648-652
9. **Sapolsky RM** 2000 Stress hormones: good and bad. Neurobiol Dis 7:540-542
10. **Podolsky DK** 2002 Inflammatory bowel disease. N Engl J Med 347:417-429
11. **Ahmad T, Armuzzi A, Bunce M, Mulcahy-Hawes K, Marshall SE, Orchard TR, Crawshaw J, Large O, de Silva A, Cook JT, Barnardo M, Cullen S, Welsh KI, Jewell DP** 2002 The molecular classification of the clinical manifestations of Crohn's disease. Gastroenterology 122:854-866
12. **Cuthbert AP, Fisher SA, Mirza MM, King K, Hampe J, Croucher PJ, Mascheretti S, Sanderson J, Forbes A, Mansfield J, Schreiber S, Lewis CM, Mathew CG** 2002 The contribution of NOD2 gene mutations to the risk and site of disease in inflammatory bowel disease. Gastroenterology 122:867-874
13. **Lesage S, Zouali H, Cezard JP, Colombel JF, Belaiche J, Almer S, Tysk C, O'Morain C, Gassull M, Binder V, Finkel Y, Modigliani R, Gower-Rousseau C, Macry J, Merlin F, Chamaillard M, Jannot AS, Thomas G, Hugot JP** 2002

- CARD15/NOD2 mutational analysis and genotype-phenotype correlation in 612 patients with inflammatory bowel disease. *Am J Hum Genet* 70:845-857
14. **Maeda S, Hsu LC, Liu H, Bankston LA, Iimura M, Kagnoff MF, Eckmann L, Karin M** 2005 Nod2 mutation in Crohn's disease potentiates NF-kappaB activity and IL-1beta processing. *Science* 307:734-738
  15. **Barclay GR, Turnberg LA** 1988 Effect of cold-induced pain on salt and water transport in the human jejunum. *Gastroenterology* 94:994-998
  16. **Empey LR, Fedorak RN** 1989 Effect of misoprostol in preventing stress-induced intestinal fluid secretion in rats. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 38:43-48
  17. **Podolsky DK, Madara JL, King N, Sehgal P, Moore R, Winter HS** 1985 Colonic mucin composition in primates. Selective alterations associated with spontaneous colitis in the cotton-top tamarin. *Gastroenterology* 88:20-25
  18. **Cameron HL, Perdue MH** 2005 Stress impairs murine intestinal barrier function: improvement by glucagon-like peptide-2. *J Pharmacol Exp Ther* 314:214-220
  19. **Aguilera G** 1994 Regulation of pituitary ACTH secretion during chronic stress. *Front Neuroendocrinol* 15:321-350
  20. **Habib KE, Gold PW, Chrousos GP** 2001 Neuroendocrinology of stress. *Endocrinol Metab Clin North Am* 30:695-728; vii-viii
  21. **Pickering TG** 2001 Mental stress as a causal factor in the development of hypertension and cardiovascular disease. *Curr Hypertens Rep* 3:249-254
  22. **Bhatia V, Tandon RK** 2005 Stress and the gastrointestinal tract. *J Gastroenterol Hepatol* 20:332-339
  23. **Salem SN, Shubair KS** 1967 Non-specific ulcerative colitis in Bedouin Arabs. *Lancet* 1:473-475
  24. **Berton O, Aguerre S, Sarrieau A, Mormede P, Chaouloff F** 1998 Differential effects of social stress on central serotonergic activity and emotional reactivity in Lewis and spontaneously hypertensive rats. *Neuroscience* 82:147-159
  25. **Hata T, Nishikawa H, Itoh E, Funakami Y** 2001 Anxiety-like behavior in elevated plus-maze tests in repeatedly cold-stressed mice. *Jpn J Pharmacol* 85:189-196
  26. **Varghese AK, Verdu EF, Bercik P, Khan WI, Blennerhassett PA, Szechtman H, Collins SM** 2006 Antidepressants attenuate increased susceptibility to colitis in a murine model of depression. *Gastroenterology* 130:1743-1753
  27. **Reber SO, Obermeier F, Straub HR, Falk W, Neumann ID** 2006 Chronic intermittent psychosocial stress (social defeat/overcrowding) in mice increases the severity of an acute DSS-induced colitis and impairs regeneration. *Endocrinology* 147:4968-4976

28. **Engelmann M, Landgraf R, Wotjak CT** 2004 The hypothalamic-neurohypophysial system regulates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis under stress: an old concept revisited. *Front Neuroendocrinol* 25:132-149
29. **Harbuz MS, Lightman SL** 1992 Stress and the hypothalamo-pituitary-adrenal axis: acute, chronic and immunological activation. *J Endocrinol* 134:327-339
30. **Minton JE** 1994 Function of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and the sympathetic nervous system in models of acute stress in domestic farm animals. *J Anim Sci* 72:1891-1898
31. **Sapolsky RM, Romero LM, Munck AU** 2000 How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocr Rev* 21:55-89
32. **Chrousos GP, Gold PW** 1998 A healthy body in a healthy mind--and vice versa--the damaging power of "uncontrollable" stress. *J Clin Endocrinol Metab* 83:1842-1845
33. **Eckert R** 2002 Tierphysiologie; Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York; 4. Auflage
34. **Penzlin H** 1996 Lehrbuch der Tierphysiologie; Gustav Fischer Verlag, Jena, Stuttgart; 6. Auflage
35. **Joels M, de Kloet ER** 1992 Control of neuronal excitability by corticosteroid hormones. *Trends Neurosci* 15:25-30
36. **De Kloet ER, Vreugdenhil E, Oitzl MS, Joels M** 1998 Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. *Endocr Rev* 19:269-301
37. **Turnbull AV, Rivier CL** 1999 Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by cytokines: actions and mechanisms of action. *Physiol Rev* 79:1-71
38. **Trepel M** 2008 Neuroanatomie; Struktur und Funktion. 4. Auflage ed: Elsevier; Urban und Fischer
39. **Schmidt RF, Lang F, Thews G** 2005 Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie. 29. Auflage ed: Springer Medizin Verlag Heidelberg
40. **Levenstein S, Prantera C, Varvo V, Scribano ML, Andreoli A, Luzzi C, Arca M, Berto E, Milite G, Marcheggiano A** 2000 Stress and exacerbation in ulcerative colitis: a prospective study of patients enrolled in remission. *Am J Gastroenterol* 95:1213-1220
41. **Haller J, Fuchs E, Halasz J, Makara GB** 1999 Defeat is a major stressor in males while social instability is stressful mainly in females: towards the development of a social stress model in female rats. *Brain Res Bull* 50:33-39

42. **Zelena D, Mergl Z, Foldes A, Kovacs KJ, Toth Z, Makara GB** 2003 Role of hypothalamic inputs in maintaining pituitary-adrenal responsiveness in repeated restraint. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285:E1110-1117
43. **Carter CJ** 2007 Multiple genes and factors associated with bipolar disorder converge on growth factor and stress activated kinase pathways controlling translation initiation: implications for oligodendrocyte viability. *Neurochem Int* 50:461-490
44. **Avitsur R, Padgett DA, Sheridan JF** 2006 Social interactions, stress, and immunity. *Neurol Clin* 24:483-491
45. **Skuse D, Albanese A, Stanhope R, Gilmour J, Voss L** 1996 A new stress-related syndrome of growth failure and hyperphagia in children, associated with reversibility of growth-hormone insufficiency. *Lancet* 348:353-358
46. **Mazzon E, Cuzzocrea S** 2008 Role of TNF-alpha in ileum tight junction alteration in mouse model of restraint stress. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 294:G1268-1280
47. **Mazzon E, Cuzzocrea S** 2006 Thalidomide treatment reduces the alteration of paracellular barrier function in mice ileum during experimental colitis. *Shock* 25:515-521
48. **Lüllmann-Rauch R** 2003 Histologie. 1. Auflage ed: Thieme
49. **Boudry G, Jury J, Yang PC, Perdue MH** 2007 Chronic psychological stress alters epithelial cell turn-over in rat ileum. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 292:G1228-1232
50. **Niess JH, Monnikes H, Dignass AU, Klapp BF, Arck PC** 2002 Review on the influence of stress on immune mediators, neuropeptides and hormones with relevance for inflammatory bowel disease. *Digestion* 65:131-140
51. **Hageman O** 2007 Laborlexikon; [http://www.labor-bochum.de/Lexikon/Infoframe/i/IqA\\_sekretorisch.htm](http://www.labor-bochum.de/Lexikon/Infoframe/i/IqA_sekretorisch.htm). In:
52. **Wehkamp J, Schaubert J, Stange EF** 2007 Defensins and cathelicidins in gastrointestinal infections. *Curr Opin Gastroenterol* 23:32-38
53. **Harder J, Siebert R, Zhang Y, Matthiesen P, Christophers E, Schlegelberger B, Schroder JM** 1997 Mapping of the gene encoding human beta-defensin-2 (DEFB2) to chromosome region 8p22-p23.1. *Genomics* 46:472-475
54. **Fellermann K, Wehkamp J, Herrlinger KR, Stange EF** 2003 Crohn's disease: a defensin deficiency syndrome? *Eur J Gastroenterol Hepatol* 15:627-634

55. **Lillard JW, Jr., Boyaka PN, Chertov O, Oppenheim JJ, McGhee JR** 1999 Mechanisms for induction of acquired host immunity by neutrophil peptide defensins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:651-656
56. **Yang D, Chen Q, Chertov O, Oppenheim JJ** 2000 Human neutrophil defensins selectively chemoattract naive T and immature dendritic cells. *J Leukoc Biol* 68:9-14
57. **Yang D, Chertov O, Bykovskaia SN, Chen Q, Buffo MJ, Shogan J, Anderson M, Schroder JM, Wang JM, Howard OM, Oppenheim JJ** 1999 Beta-defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6. *Science* 286:525-528
58. **Zaslloff M** 2002 Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 415:389-395
59. **Zanetti M, Gennaro R, Romeo D** 1995 Cathelicidins: a novel protein family with a common proregion and a variable C-terminal antimicrobial domain. *FEBS Lett* 374:1-5
60. **Cowland JB, Johnsen AH, Borregaard N** 1995 hCAP-18, a cathelin/pro-bactenecin-like protein of human neutrophil specific granules. *FEBS Lett* 368:173-176
61. **Oren Z, Lerman JC, Gudmundsson GH, Agerberth B, Shai Y** 1999 Structure and organization of the human antimicrobial peptide LL-37 in phospholipid membranes: relevance to the molecular basis for its non-cell-selective activity. *Biochem J* 341 ( Pt 3):501-513
62. **Sorensen OE, Follin P, Johnsen AH, Calafat J, Tjabringa GS, Hiemstra PS, Borregaard N** 2001 Human cathelicidin, hCAP-18, is processed to the antimicrobial peptide LL-37 by extracellular cleavage with proteinase 3. *Blood* 97:3951-3959
63. **Kurosaka K, Chen Q, Yarovsky F, Oppenheim JJ, Yang D** 2005 Mouse cathelin-related antimicrobial peptide chemoattracts leukocytes using formyl peptide receptor-like 1/mouse formyl peptide receptor-like 2 as the receptor and acts as an immune adjuvant. *J Immunol* 174:6257-6265
64. **Ferrier L, Mazelin L, Cenac N, Desreumaux P, Janin A, Emilie D, Colombel JF, Garcia-Villar R, Fioramonti J, Bueno L** 2003 Stress-induced disruption of colonic epithelial barrier: role of interferon-gamma and myosin light chain kinase in mice. *Gastroenterology* 125:795-804
65. **Mazzon E, Sturniolo GC, Puzzolo D, Frisina N, Fries W** 2002 Effect of stress on the paracellular barrier in the rat ileum. *Gut* 51:507-513

66. **Soderholm JD, Yang PC, Ceponis P, Vohra A, Riddell R, Sherman PM, Perdue MH** 2002 Chronic stress induces mast cell-dependent bacterial adherence and initiates mucosal inflammation in rat intestine. *Gastroenterology* 123:1099-1108
67. **Santos J, Saunders PR, Hanssen NP, Yang PC, Yates D, Groot JA, Perdue MH** 1999 Corticotropin-releasing hormone mimics stress-induced colonic epithelial pathophysiology in the rat. *Am J Physiol* 277:G391-399
68. **Karlinger K, Gyorke T, Mako E, Mester A, Tarjan Z** 2000 The epidemiology and the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Eur J Radiol* 35:154-167
69. **Franke A, Balschun T, Karlsen TH, Sventoraityte J, Nikolaus S, Mayr G, Domingues FS, Albrecht M, Nothnagel M, Ellinghaus D, Sina C, Onnie CM, Weersma RK, Stokkers PC, Wijmenga C, Gazouli M, Strachan D, McArdle WL, Vermeire S, Rutgeerts P, Rosenstiel P, Krawczak M, Vatn MH, Mathew CG, Schreiber S** 2008 Sequence variants in IL10, ARPC2 and multiple other loci contribute to ulcerative colitis susceptibility. *Nat Genet* 40:1319-1323
70. **Gearry RB, Richardson AK, Frampton CM, Dodgshun AJ, Barclay ML** Population-based cases control study of inflammatory bowel disease risk factors. *J Gastroenterol Hepatol* 25:325-333
71. **AWMF** S3-Leitlinie Gastroenterologie; Diagnostik und Therapie der *Colitis Ulcerosa*; <http://www.uni-duesseldorf.de/AWMF/II/021-009.htm>.
72. **Graff LA, Walker JR, Clara I, Lix L, Miller N, Rogala L, Rawsthorne P, Bernstein CN** 2009 Stress coping, distress, and health perceptions in inflammatory bowel disease and community controls. *Am J Gastroenterol* 104:2959-2969
73. **Leon AJ, Gomez E, Garrote JA, Bernardo D, Barrera A, Marcos JL, Fernandez-Salazar L, Velayos B, Blanco-Quiros A, Arranz E** 2009 High levels of proinflammatory cytokines, but not markers of tissue injury, in unaffected intestinal areas from patients with IBD. *Mediators Inflamm* 2009:580450
74. Deutsche Morbus Crohn/ Colitis Ulcerosa Vereinigung DCCV e. V.; [http://www.dccv.de/crohn-colitis/medizinische-grundlagen/basiswissen/faq-haeufig-gestellte-fragen/was-ist-eine-chronisch-entzuendliche-darmerkrankung-ced/#irfaq\\_8\\_aaf05](http://www.dccv.de/crohn-colitis/medizinische-grundlagen/basiswissen/faq-haeufig-gestellte-fragen/was-ist-eine-chronisch-entzuendliche-darmerkrankung-ced/#irfaq_8_aaf05).
75. **Cohn EM, Lederman, II, Shore E** 1970 Regional enteritis and its relation to emotional disorders. *Am J Gastroenterol* 54:378-387

76. **Mardini HE, Kip KE, Wilson JW** 2004 Crohn's disease: a two-year prospective study of the association between psychological distress and disease activity. *Dis Sci* 49:492-497
77. **Bethyl** Mouse IgA ELISA Quantitation Set;  
<http://www.bethyl.com/product/pdf/E90-103.pdf>.
78. **Blaas SH, Stieber-Gunckel M, Falk W, Obermeier F, Rogler G** 2009 CpG-oligodeoxynucleotides stimulate immunoglobulin A secretion in intestinal mucosal B cells. *Clin Exp Immunol* 155:534-540
79. **McDowall J** 2004 Caspases. In: InterPro RCSB Protein Data Bank;  
[http://www.rcsb.org/pdb/staticdo?p=education\\_discussion/molecule\\_of\\_the\\_month/pdb56\\_1.html](http://www.rcsb.org/pdb/staticdo?p=education_discussion/molecule_of_the_month/pdb56_1.html)
80. **Rickers A** 1999 Identifikation molekularer Regulatoren der anti-IgM induzierten B-Zell Apoptose.
81. **Chapman RS, Chresta CM, Herberg AA, Beere HM, Heer S, Whetton AD, Hickman JA, Dive C** 1995 Further characterisation of the in situ terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) assay for the flow cytometric analysis of apoptosis in drug resistant and drug sensitive leukaemic cells. *Cytometry* 20:245-256
82. **Calbiochem** 2007 Fluorescein FragEL DNA Fragmentation Detection Kit (Kat. No. QIA39) User Protocol. In:
83. **Schild T** Einführung in die Real-Time TaqMan<sup>®</sup> PCR-Technologie; 7700 SDS Workshop; <http://www.core-facility.uni-freiburg.de/lc480/lc480obj/sdsman>.
84. **QIAGEN** 2006 RNeasy<sup>®</sup> Mini Handbook. In:
85. **QIAGEN** 2005 RNase Free DNase Set; Handbook;  
<http://www1.qiagen.com/Products/Accessories/RNase-FreeDNaseSet.aspx#Tabs=t2>.
86. **Invitrogen** 2008 Quant-iT<sup>™</sup> RiboGreen<sup>®</sup> RNA Reagent and Kit;  
<http://probes.invitrogen.com/media/pis/mp11490.pdf>.
87. **Promega** 2000-2009 Reverse Transcription System; INSTRUCTIONS FOR USE OF PRODUCT A3500; <http://www.promega.com/protcards/9fb039/fb039.pdf>.
88. **Gerdes J** 1990 Ki-67 and other proliferation markers useful for immunohistological diagnostic and prognostic evaluations in human malignancies. *Semin Cancer Biol* 1:199-206
89. **Gerlach C, Sakkab DY, Scholzen T, Dassler R, Alison MR, Gerdes J** 1997 Ki-67 expression during rat liver regeneration after partial hepatectomy. *Hepatology* 26:573-578

90. **Vector-Laboratories** 2009 Vectastain ABC Kit - Instructions for Immunohistochemical Staining;  
<http://www.vectorlabs.com/Protocols/VECTASTAIN/PK4000.pdf>.
91. **Deitch EA** 1990 Bacterial translocation of the gut flora. *J Trauma* 30:S184-189
92. **Bale TL** 2006 Stress sensitivity and the development of affective disorders. *Horm Behav* 50:529-533
93. **Nestler EJ, Barrot M, DiLeone RJ, Eisch AJ, Gold SJ, Monteggia LM** 2002 Neurobiology of depression. *Neuron* 34:13-25
94. **Strike PC, Steptoe A** 2004 Psychosocial factors in the development of coronary artery disease. *Prog Cardiovasc Dis* 46:337-347
95. **Meddings JB, Swain MG** 2000 Environmental stress-induced gastrointestinal permeability is mediated by endogenous glucocorticoids in the rat. *Gastroenterology* 119:1019-1028
96. **Bouma G, Strober W** 2003 The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol* 3:521-533
97. **Van der Sluis M, De Koning BA, De Bruijn AC, Velcich A, Meijerink JP, Van Goudoever JB, Buller HA, Dekker J, Van Seuningen I, Renes IB, Einerhand AW** 2006 Muc2-deficient mice spontaneously develop colitis, indicating that MUC2 is critical for colonic protection. *Gastroenterology* 131:117-129
98. **Strater J, Wellisch I, Riedl S, Walczak H, Koretz K, Tandara A, Krammer PH, Moller P** 1997 CD95 (APO-1/Fas)-mediated apoptosis in colon epithelial cells: a possible role in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 113:160-167
99. **Ruzankina Y, Schoppy DW, Asare A, Clark CE, Vonderheide RH, Brown EJ** 2009 Tissue regenerative delays and synthetic lethality in adult mice after combined deletion of Atr and Trp53. *Nat Genet* 41:1144-1149
100. **Marin ML, Geller SA, Greenstein AJ, Marin RH, Gordon RE, Aufses AH, Jr.** 1983 Ultrastructural pathology of Crohn's disease: correlated transmission electron microscopy, scanning electron microscopy, and freeze fracture studies. *Am J Gastroenterol* 78:355-364
101. **Marin ML, Greenstein AJ, Geller SA, Gordon RE, Aufses AH, Jr.** 1983 A freeze fracture study of Crohn's disease of the terminal ileum: changes in epithelial tight junction organization. *Am J Gastroenterol* 78:537-547
102. **Greant P, Delvaux G, Willems G** 1988 Influence of stress on epithelial cell proliferation in the gut mucosa of rats. *Digestion* 40:212-218



103. **Vetuschi A, Latella G, Sferra R, Caprilli R, Gaudio E** 2002 Increased proliferation and apoptosis of colonic epithelial cells in dextran sulfate sodium-induced colitis in rats. *Dig Dis Sci* 47:1447-1457
104. **Cunliffe RN, Kamal M, Rose FR, James PD, Mahida YR** 2002 Expression of antimicrobial neutrophil defensins in epithelial cells of active inflammatory bowel disease mucosa. *J Clin Pathol* 55:298-304
105. **Cunliffe RN, Rose FR, Keyte J, Abberley L, Chan WC, Mahida YR** 2001 Human defensin 5 is stored in precursor form in normal Paneth cells and is expressed by some villous epithelial cells and by metaplastic Paneth cells in the colon in inflammatory bowel disease. *Gut* 48:176-185
106. **Lawrance IC, Fiocchi C, Chakravarti S** 2001 Ulcerative colitis and Crohn's disease: distinctive gene expression profiles and novel susceptibility candidate genes. *Hum Mol Genet* 10:445-456
107. **Wehkamp J, Schwind B, Herrlinger KR, Baxmann S, Schmidt K, Duchrow M, Wohlschlager C, Feller AC, Stange EF, Fellermann K** 2002 Innate immunity and colonic inflammation: enhanced expression of epithelial alpha-defensins. *Dig Dis Sci* 47:1349-1355
108. **Alonso C, Guilarte M, Vicario M, Ramos L, Ramadan Z, Antolin M, Martinez C, Rezzi S, Saperas E, Kochhar S, Santos J, Malagelada JR** 2008 Maladaptive intestinal epithelial responses to life stress may predispose healthy women to gut mucosal inflammation. *Gastroenterology* 135:163-172 e161
109. **Yel L** Selective IgA deficiency. *J Clin Immunol* 30:10-16
110. **Jarillo-Luna A, Rivera-Aguilar V, Garfias HR, Lara-Padilla E, Kormanovsky A, Campos-Rodríguez R** 2007 Effect of repeated restraint stress on the levels of intestinal IgA in mice. *Psychoneuroendocrinology* 32:681-692
111. **Reyna-Garfias H, Miliar A, Jarillo-Luna A, Rivera-Aguilar V, Pacheco-Yeppez J, Baeza I, Campos-Rodríguez R** Repeated restraint stress increases IgA concentration in rat small intestine. *Brain Behav Immun* 24:110-118
112. **Anderlik P, Szeri I, Banos Z, Barna Z** 1990 Bacterial translocation after cold stress in young and old mice. *Acta Microbiol Hung* 37:289-294
113. **Berg RD** 1992 Bacterial translocation from the gastrointestinal tract. *J Med* 23:217-244
114. **Everson CA, Toth LA** 2000 Systemic bacterial invasion induced by sleep deprivation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 278:R905-916

115. **Velin AK, Ericson AC, Braaf Y, Wallon C, Soderholm JD** 2004 Increased antigen and bacterial uptake in follicle associated epithelium induced by chronic psychological stress in rats. *Gut* 53:494-500
116. **Ando T, Brown RF, Berg RD, Dunn AJ** 2000 Bacterial translocation can increase plasma corticosterone and brain catecholamine and indoleamine metabolism. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 279:R2164-2172
117. **Bailey MT, Engler H, Sheridan JF** 2006 Stress induces the translocation of cutaneous and gastrointestinal microflora to secondary lymphoid organs of C57BL/6 mice. *J Neuroimmunol* 171:29-37
118. **Nuding S, Fellermann K, Wehkamp J, Mueller HA, Stange EF** 2006 A flow cytometric assay to monitor antimicrobial activity of defensins and cationic tissue extracts. *J Microbiol Methods* 65:335-345

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all jenen danken, die durch ihre fachliche und persönliche Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herzlichster Dank gilt vor allem meinem Doktorvater **Herrn Prof. Dr. med. Florian Obermeier** für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe anfertigen zu können. Seine wertvollen Ratschläge, Anregungen und Ermutigungen waren stets eine große Unterstützung für mich.

Mein ganz besonderer Dank richtet sich an **Prof. Dr. rer. nat. Stefan O. Reber** für die erneute großartige Betreuung während meiner Doktorarbeit. Er stand mir stets unermüdlich und sehr geduldig mit Rat und Tat zur Seite und hatte jederzeit ein offenes Ohr für meine Fragen und Probleme.

Außerdem möchte ich mich ganz herzlich bei **Nicole Grunwald** für ihre tatkräftige Unterstützung und die geduldige Hilfe bei den Experimenten bedanken, ohne die ich im Labor manchmal „verloren“ gewesen wäre ☺. Tausend Dank!

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner **Familie**, die mir dieses Studium ermöglichte, mich dabei stets unterstützte und mir bei all meinen Entscheidungen zur Seite stand und steht.

**ERKLÄRUNG ZUM PROMOTIONSVERFAHREN**

nach § 3 Abs. 3 und 4 der Promotionsordnung  
der Fakultät für Medizin der Universität Regensburg

Name: Beitelrock  
Vorname: Nadja  
Geb. am: 22.10.1981  
In: Augsburg

Ich erkläre,

- dass ich den **Doktorgrad der Medizin** nicht schon an einer Hochschule der Bundesrepublik Deutschland erworben habe
- dass ich nicht an anderer Stelle zu einem Promotionsverfahren zum Erwerb des **medizinischen Doktorgrades** zugelassen bin
- dass ich die **medizinische Doktorprüfung** nicht schon an einer Hochschule der Bundesrepublik Deutschland endgültig nicht bestanden habe

Außerdem erkläre ich,

- dass mir keine Tatsachen bekannt sind, die mich zur Führung eines akademischen Grades im Sinne des Gesetzes über die Führung akademischer Grade unwürdig erscheinen lassen
- dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Augsburg, 28.04.2014

(Ort, Datum)

---

(Nadja Beitelrock)